



TITLE:

# mRNAプライシングにおけるキャップ構造の役割に関する研究(Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

大野, 睦人

---

CITATION:

大野, 睦人. mRNAプライシングにおけるキャップ構造の役割に関する研究. 京都大学, 1989, 理学博士

ISSUE DATE:

1989-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k4200>

RIGHT:



新制

理

653

京大附図

学位申請論文

大野 睦人



mRNA スプライシング  
におけるキャップ構造の  
役割に関する研究

大野 睦人

## 要旨

複数のイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライシング様式に興味を持ち、 $\delta$ -クリスタリン遺伝子由来の二つのイントロンを持つ人工的な mRNA 前駆体を作成し、そのスプライシング様式およびそれに対するキャップ構造の影響を、HeLa細胞核抽出液を用いた *in vitro* スプライシング系によって調べた。mRNA 前駆体がキャップ構造を持つ場合には、上流側イントロンの方が、下流側イントロンよりもはるかに効率よく除去され、結果として、最終産物が効率よく産生された。mRNA 前駆体がキャップ構造を持たない場合は、下流側イントロンは、キャップ構造を持つ場合と同様の比較的低い効率で除去されるのに対して、上流側イントロンのスプライシングは極端に阻害され、同時に最終産物の産生もほとんどみられなくなった。この二つのイントロンの mRNA 前駆体上の位置関係を前後逆にした人工 mRNA 前駆体においてもまったく同様の結果が得られたことから、キャップ構造は、それに近い方のイントロンのスプライシングを強く促進するが、遠い方のイントロンのスプライシングには影響しないと考えられた。このようにキャップ構造は、単に mRNA 前駆体を安定化するという消極的役割だけでなく、スプライシングに積極的に関与していることが明らかになった。

次に、*in vitro* スプライシング系においてみられたキャップ構造の効果が、実際の細胞内においてもみられるかどうかを調べるため、アフリカツメガエルの卵母細胞核に mRNA 前駆体を微量注入して、そのスプライシングを調べる実験を行った。従来、卵母細胞核内においてはキャップ構造を持たない RNA は速やかに分解されるため、キャップ構造の効果を安定性と独立に調べることが不可能であったが、アデノシンを blocking nucleoside として持つ mRNA 前駆体を、キャップ構造のない mRNA 前駆体の代わりとして使用するというトリックを用いることにより、この問題点を解決すること成功した。その結果、卵母細胞核内においても、*in vitro* スプライシング系とほぼ同様の結果が得られ、細胞内においても、キャップ構造がスプライシングに積極的に関与していることが明らかになった。

以上の結果は、キャップ構造を特異的に認識する因子がスプライシングに



関与していることを強く示唆していたので、次に、核内に存在し、キャップ構造に特異的に結合する因子の探索を行った。キャップ構造を持つRNAをプローブとするゲル移動度シフト法を開発することにより、分子量8万ダルトンのキャップ構造結合蛋白（CAPRECONと名付けた）をHeLa細胞核抽出液中に同定し、それをhomogeneityにまで精製することに成功した。このCAPRECONのキャップ構造への結合には、blocking guanosineの7位のメチル基が重要であることが分かった。また、CAPRECONは、スプライシング因子であるU2 snRNPと部分的に会合していることが免疫沈降実験の結果明らかになり、スプライシングに関与するキャップ構造結合蛋白の有力な候補であると考えられた。

## 目次

第 I 章	序論	1
a)	はじめに	1
b)	メッセンジャーRNA のスプライシング	1
c)	スプライス部位の塩基配列	2
d)	<u>in vitro</u> スプライシング系の開発	3
e)	スプライシングの反応経路とラリアット型中間体	5
f)	スプライスソームとスプライシング因子	9
g)	スプライシングにおけるATP 要求性について	15
h)	スプライス部位の選択における二つの問題	18
i)	Alternative SplicingとTrans Splicing	23
j)	tRNAのスプライシング	27
k)	Self-Splicing	29
l)	イントロンの起源と進化	31
m)	本研究の背景	33
第 II 章	材料と方法	35
a)	酵素と試薬	35
b)	プラスミドの作製	35
c)	mRNA前駆体の調製	36
d)	HeLa細胞からの核抽出液、細胞質S100フラクション、 及びリボソームhigh salt washフラクションの調製	36
e)	<u>in vitro</u> スプライシング反応	37
f)	アフリカツメガエル卵母細胞核への微量注入	37
g)	プローブRNA の調製	38
h)	RNA をプローブとするゲル移動度シフト法	38
i)	Capped RNA-Sepharoseの調製	38
j)	キャップ構造結合蛋白の精製	39
k)	免疫沈降	40

1) UVによる蛋白とRNA のcrosslink .....	4 1
第III章 実験結果 .....	4 2
第1節 mRNAスプライシング反応に対するキャップ構造の影響:	
<u>in vitro</u> スプライシング系による解析 .....	4 2
a) mRNA前駆体の調製 .....	4 2
b) 二つのイントロンを同一分子内に含むmRNA前駆体の	
<u>in vitro</u> スプライシング .....	4 5
c) 二つのイントロンを持つmRNA前駆体のスプライシング	
に対するキャップ構造の影響 .....	4 5
d) $\delta$ E X 1 3 - 1 4 - 1 5 mRNA前駆体のスプライシング	
のキャップ構造類似体による阻害 .....	5 1
第2節 mRNAスプライシング反応に対するキャップ構造の影響:	
アフリカツメガエル卵母細胞核への微量注入法による解析 ...	5 7
a) 5' 末端にアデノシン残基をblocking nucleoside	
として持つmRNA前駆体の作成 .....	5 7
b) アフリカツメガエル卵母細胞核内における	
$\delta$ E X 1 4 - 1 5 mRNA前駆体のスプライシング	
に対するキャップ構造の効果 .....	6 0
c) アフリカツメガエル卵母細胞核内における	
二つのイントロンを持つmRNA前駆体のスプライシング	
に対するキャップ構造の効果 .....	6 5
第3節 核内キャップ構造結合蛋白 .....	6 9
a) HeLa細胞の核内キャップ構造結合因子の同定 .....	6 9
b) 核内キャップ構造結合因子の性質 .....	7 2
c) 核内キャップ構造結合蛋白 (CAPRECON) の精製 .....	7 6
d) 核内キャップ構造結合蛋白のスプライシング因子との会合	7 9
第IV章 考察 .....	8 5
a) スプライシングシグナルとしてのキャップ構造 .....	8 5
b) 二つのイントロンを持つmRNA前駆体のスプライシング経路	8 7



c) 核内キャップ構造結合蛋白 .....	9 1
d) キャップ構造によるスプライシングの促進機構 .....	9 5
e) キャップ構造による促進効果の限定性の問題 .....	9 7
第 V 章 今後の課題 .....	9 9
a) mRNAスプライシングと核マトリクス .....	9 9
b) Catalystの実体 .....	9 9
c) スプライス部位の選択の問題 .....	1 0 0
d) mRNAスプライシングにおける調節 .....	1 0 1
謝辞 .....	1 0 2
文献 .....	1 0 3

## 第 I 章 序論

### a) はじめに

本論文を叙述するにあたり、本研究の意義を明確にするために、RNA スプライシングの分野を鳥瞰してみることにする。

蛋白質あるいは RNA をコードする遺伝子を分断化する塩基配列は、一括して介在配列あるいはイントロンと定義され、RNA 転写物内からのイントロンの除去反応は RNA スプライシングと呼ばれる。イントロンはそのスプライシング機構の違いやイントロン内部の塩基配列の類似性によって次の 4 種に分類できる。

- 1) 真核細胞の核にコードされる蛋白質遺伝子を分断化するイントロン。
  - 2) 真核細胞の核にコードされるトランスファー RNA (tRNA) 遺伝子を分断化するイントロン。
  - 3) テトラヒメナの核コードのリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子や、ミトコンドリアや葉緑体にコードされる蛋白質や tRNA の遺伝子を分断化するグループ I イントロン。
  - 4) ミトコンドリアや葉緑体にコードされる蛋白質や tRNA の遺伝子を分断化するグループ II イントロン。
- 3) と 4) のグループ I & II イントロンは元来、ミトコンドリアのイントロンをその内部の塩基配列の共通性から 2 つに分類したものであるが、これらのイントロンのあるものは後述するようにセルフスプライシングすることが知られている。ここではまず、1) のイントロンのスプライシング (mRNA スプライシング) について現在までに明らかになっていることを筆者の考えもまじえて概説し、後ほど 2) - 4) のタイプのスプライシングについても簡単に触れることにする。

### b) メッセンジャー RNA のスプライシング

真核生物の蛋白質をコードする遺伝子が発現する過程において、その遺伝子の転写物は様々な構造変換を受けた後に、初めて情報担体として機能するメッセンジャー RNA (mRNA) となることが知られている。RNA の 5' 末端は、

キャップ構造と呼ばれる mRNA に特徴的な構造 ( $m^7GpppNmN$ ) に修飾され、また 3' 末端側は、特定の部位で RNA 鎖の切断が起こり 200 残基程度のポリ(A) 配列が付加される。しかし、最も劇的な構造変換は、mRNA 前駆体上からイントロン配列の除去される反応であり、この反応は mRNA スプライシングと呼ばれる。

1977 年、アデノウイルス後期蛋白質の遺伝子が、蛋白質をコードしない配列 (イントロン) によって分断化されていることが、ウイルス DNA と mRNA のヘテロデュプレックスを電子顕微鏡で観察することにより明らかになった (Berget ら, 1977; Chow ら, 1977)。以来、多くの高等真核生物の蛋白遺伝子の構造が解析され、それらの大部分がイントロンをもっていることが明らかになった。1 つの蛋白質遺伝子を分断するイントロンはその数においても長さにおいても様々であるが、分断化された遺伝情報が発現するためには、まずイントロンを含むメッセンジャー RNA 前駆体として転写された後、イントロン部分だけが正確に除去されて成熟 mRNA となることが必要である。従って mRNA スプライシングは、高等真核生物の遺伝子発現に必須な過程であると言える。

### c) スプライス部位の塩基配列

高等生物遺伝子の塩基配列のデータが蓄積してくると共に、イントロンとエキソンの境界部には共通性の高い塩基配列が存在することが明らかになってきた。すなわち、5' スプライス部位の AG/GTAAGT と 3' スプライス部位の (Py)nNCAG/G である (Mount, 1982)。これらの共通配列は、イントロンの両端の GT および AG 配列以外はそれほど高度に保存されているわけではない。この GT-AG 則は、最初に Chambon のグループによって指摘されたことから (Breathnach ら, 1978) Chambon's rule と呼ばれるが、ほんの一部の例外 (Dodgeson と Engel, 1983; Erbil と Niessing, 1983; King と Piatigorsky, 1983) を除いてほぼ 100% 当てはまる。そしてその例外はすべて 5' スプライス部位が GT ではなく GC であることである。*in vitro* スプライシング系が開発される以前の比較的初期の研究によって、これらの共通配列の変異によってスプライシングの異常が起こることが示され、これらの配列がスプライシング



のシグナルとして働いていることが明らかになった。ヒトの遺伝病である $\beta$ -サラセミアのいくつかは、 $\beta$ -グロビン遺伝子上のこれら共通配列に起こった突然変異のため、スプライシングが異常になり、正常なグロビンが産生されないことが原因であることがわかった (Fukumakiら, 1982; Treisman ら, 1983)。また、血清中にアルブミンをまったく持たないラットが偶然日本で発見されたが、アルブミン遺伝子の8番目のイントロンの5' スプライス部位近傍に小さな欠失変異があるため、このイントロンのスプライシングが異常になっていることが明らかにされた (Esumiら, 1983)。Weissmannらのグループは、ウサギ $\beta$ -グロビン遺伝子の5' スプライス部位配列をGTからATに人工的に改変すると *in vivo* でスプライシングの異常が起こることを示した (Wieringaら, 1983)。また、Aebiらはスプライス部位配列に様々な塩基置換を導入した $\beta$ -グロビンmRNA前駆体のスプライシングを *in vitro* (後述) と *in vivo* で詳細に調べ、両スプライス部位配列の変異がスプライシングに様々な影響を与えることを明らかにした (Aebiら, 1986)。

#### d) *in vitro*スプライシング系の開発

*in vivo* における研究は、スプライシングに必要なmRNA前駆体上の塩基配列を部分的に明らかにすることはできたが、スプライシング反応の詳細や、それに関与する因子の解析は、*in vitro*スプライシング系の開発を待たねばならなかった。イントロンの発見の翌年 (1978) 頃から、アデノウイルスが感染したHeLa細胞の単離核を用いて、*in vivo* で産生されたウイルスmRNA前駆体のスプライシング反応を *in vitro* で再開させる系が開発されたが (Blanchardら, 1978)、この系ではスプライシング反応の詳細な解析は不可能であった。近年、いくつかの研究グループにおいて、無細胞抽出液を用いたmRNA前駆体の *in vitro* スプライシング系が開発され (HernandezとKeller, 1983; Padgettら, 1983a; Krainerら, 1984; Newman ら, 1985)、スプライシング反応の詳細な解析が可能になった。これらの研究グループでは、若干の相違はあるが、*in vitro* で合成したmRNA前駆体を無細胞抽出液で処理し、スプライシング産物を解析するという方法を取っている。*in vitro* スプライシング系の開発にあたって必須でありかつ困難であったことは、基質であるmRNA前駆

体をいかにして十分量得るかということであった。この問題は、原核生物の *in vitro* 転写反応系を用いて、真核生物の遺伝子を転写させることによって克服された。すなわち、原核生物のプロモータ配列を持つ DNA の下流に適当なイントロンを持つ真核生物の遺伝子を連結したものを、精製した原核生物 RNAポリメラーゼを用いて *in vitro* で転写することによって、mRNA前駆体を調製するのである。最も広く使われている転写系は、サルモネラ菌のファージ SP6 の後期遺伝子のプロモータとこのファージにコードされる RNAポリメラーゼを用いる系である (Greenら, 1983)。その他、T7ファージの RNAポリメラーゼの系 (Davanlooら, 1984) や大腸菌 RNAポリメラーゼの系 (Ohnoら, 1987; Sakamotoら, 1987) も用いられている。これら原核生物のシステムを用いた転写系では、転写反応液中に  $m^7GpppN$  等のキャップ構造類似体を入れると、RNA 合成のプライマーとして機能する結果、RNA の 5' 末端に効率よくキャップ構造を形成させることができる (Contrerasら, 1982)。

無細胞抽出液としては、HeLa細胞の核抽出液が最もよく使われている。それ以外にも、マウスプラスマサイトーマ由来の細胞株であるMOPC細胞 (GoldenbergとHauser, 1983) や酵母 (*S.cerevisiae*) (Nermanら, 1985) から、スプライシング活性のある抽出液が調製されているが、ここで紹介する成果の大部分は、HeLa細胞核抽出液を用いた研究から得られたものである。*in vitro* スプライシング反応は、1 価の陽イオンと 2 価の陽イオン ( $Mg^{2+}$ ) および ATPを要求することや、スプライシングの反応産物が検出されるまでに 15 - 45 分の遅滞時間があることが明らかになった (Hardyら, 1984; Krainerら, 1984)。細胞内の典型的なmRNA前駆体は、5' 末端のキャップ構造の他に 3' 末端にポリ(A) 配列を持っている。*in vitro* 系が開発される以前に行われた、mRNA前駆体をアフリカツメガエルの卵母細胞核に微量注入してスプライシングを解析した実験 (Greenら, 1983) によれば、ポリ(A) 配列はスプライシング反応に全く影響しなかった。また、キャップ構造については、キャップ構造を持たないmRNA前駆体は卵母細胞核内で速やかに分解されるため、少なくともmRNA前駆体の安定性に寄与しているということしか分からなかった。*in vitro* 系を用いて、これらの構造の必要性が調べられた (Krainerら, 1984)。ポリ(A) 配列については、その有無で差がみられなかったことから、

スプライシングに必要ないと結論された。しかし、この実験は単一のイントロンしか持たない mRNA 前駆体を用いている。複数のイントロンを持つ mRNA 前駆体ではポリ(A)が何らかの機能を果たすかも知れないという可能性は否定できない。これに対して、キャップ構造は、*in vitro* スプライシング反応そのものに必須ではないが、反応を 3-4 倍程度促進することが分かった。しかし、キャップ構造は RNA の安定性を高めているに過ぎないのか、あるいはスプライシングに積極的に関与しているのかは明らかにはならなかった。後述するように、後者が正しいことが明らかになった (Ohno ら, 1987; Sakamoto ら, 1987)。

#### e) スプライシングの反応経路とラリアット型中間体

*in vitro* スプライシング系の開発により、スプライシングの反応様式や中間体の詳細な解析が可能になった。その結果、スプライシングは二段階の反応から成り、その反応過程でイントロンがラリアット構造 (投げ縄型構造、または枝分かれ環状構造) を形成することが明らかにされた。すなわち、スプライシング反応においては、図 1 に示すように、まず 5' スプライス部位が切断され、その結果生じたイントロンの 5' 末端がイントロンの 3' 末端付近のブランチ部位と呼ばれる配列の中のアデノシン残基と 2' - 5' リン酸ジエステル結合を形成しラリアット構造を作る (ステップ 1)。続いて、3' スプライス部位の切断と 2 つのエキシソンの連結が起こり、ラリアット型イントロンが放出されるのである (ステップ 2) (Padgett ら, 1984; Ruskin ら, 1984)。注目すべきことは、各ステップにおいてリン酸ジエステル結合の数が保存されているということである。このことは各ステップの反応がエステル交換反応 (transesterification) によって起こっていることを示唆している。この問題に関しては、セルフスプライシングイントロンとの関連性において、スプライシングにおける ATP の要求性の項で再び述べる。

ブランチ部位の配列は、3' スプライス部位の 18-37 塩基上流にある PyNPYUPuAPy を中心にした配列であると指摘されているが (Ruskin ら, 1984)、高等真核生物の場合、この配列は必ずしも厳密ではなく、正常なブランチ部位の配列を欠失させてもその付近のアデノシン残基で枝分かれ構造の形成



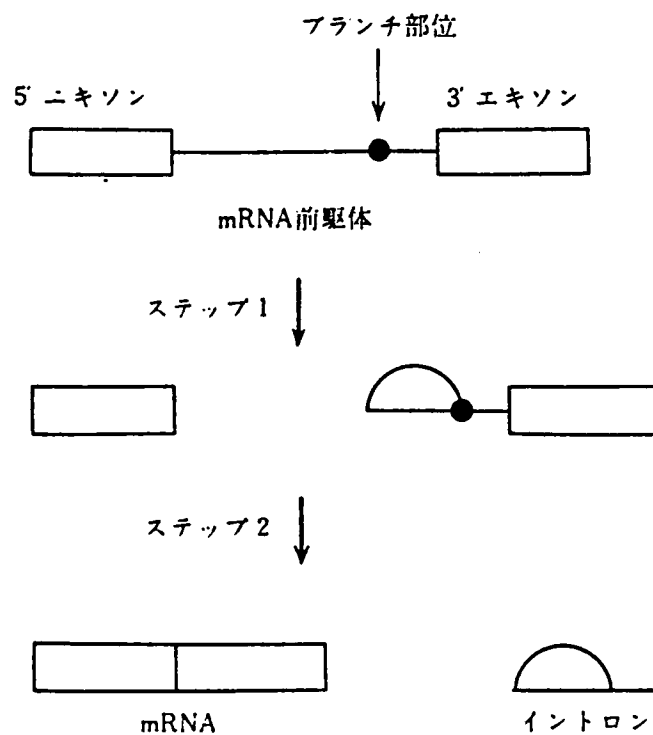


図 1. mRNA前駆体のスプライシングにおける二段階反応。

ステップ1で5' スプライス部位の切断とブランチ構造の形成が起き、ついでステップ2で3' スプライス部位の切断とエキソン同士の連結が起こる。各ステップにおいてリン酸ジエステル結合の数が保存されている。

(branching) が起こることが報告されている (Ruskinら, 1985; Rautmann と Breathnach, 1985)。このことは、 $\beta$ -グロビン遺伝子を用いたイントロン内部の欠失実験から、スプライス部位以外のイントロン配列はスプライシングに必須ではない (Wieringaら, 1984; Van Santen と Spritz, 1985) という実験結果と矛盾しない。ブランチングにはアデノシン残基が好まれるが、塩基配列を改変することによりアデノシン残基以外にもブランチングを起こさせることができ、そのことがスプライシングの反応効率に様々な影響を及ぼすことが明らかにされている (Hornigら, 1986)。また、ヒトの成長ホルモンの mRNA 前駆体の場合には、自然の状態で U や C 残基にブランチングが起こっているという (Hartmuth と Barta, 1987)。これに対して酵母のスプライシングにおいては、ブランチ配列の要求性は非常に厳密であり、UACUAAC という配列 (UACUAAC ボックス) に変異が起こるとスプライシングが起こらなくなる (Langfordら, 1984)。この違いは 3' スプライス部位配列とブランチ部位配列のどちらが優先するかという問題に帰することができると思われる。すなわち、高等生物においては 3' スプライス部位が優先し、そこから一定の距離上流の部位がブランチ部位として使われるのに対して、酵母においては UACUAAC 配列が優先して、そこから一番近い下流の AG 配列が 3' スプライス部位として使われると考えることができる。しかし最近 Reed と Maniatis は、哺乳類と酵母のブランチ部位配列 (BPS) に同様な一塩基置換を導入し、これらのスプライシングを比較することにより、BPS は哺乳類においても酵母と同様の重要性を持っているという実験結果を示し、上記の考えに疑問を投げかけた (Reed と Maniatis, 1988)。しかし彼らも、哺乳類と酵母ではスプライスソーム形成 (後述) における BPS の重要性が違うことは認めており、やはり両者のスプライシング機構には何らかの違いがあることは確かなようである。細胞内においても実際、イントロンがラリアット構造を形成することが、ウサギや酵母において確認されており (Zeitlin と Efstratiadis, 1984; Rodriguezら, 1984; Domdeyら, 1984)、イントロンのラリアット構造の形成は、mRNA スプライシングの一般的経路であろうと考えられる。これに関連して、ラリアット構造が発見される以前の 1983 年に、Wallace と Edmonds が核内のポリ(A)RNA の約 10% が 2' - 5' の枝別れ構造を持っていた枝別れ

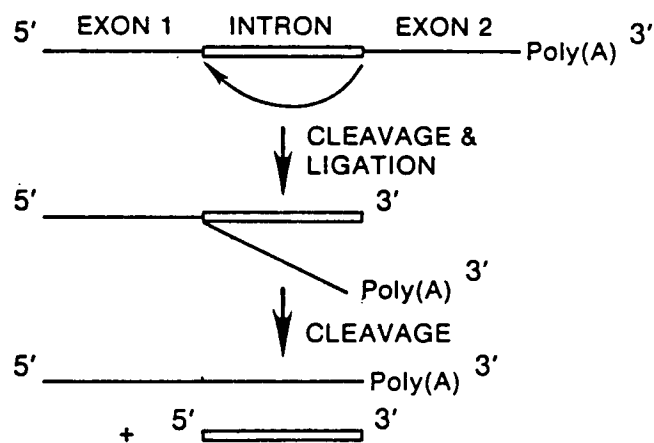


図 2. Wallace と Edmonds の考えた mRNA スプライシングのモデル (Wallace と Edmonds ら, 1983)。

まず 3' スプライス部位に切断が起こり、3' 側のエキソンが 5' スプライス部位に 2' - 5' リン酸ジエステル結合で一旦連結され、イントロンが除去されてから正常な 3' - 5' 結合に変換される。



塩基の80%がアデニン残基であることを発見し、それがRNAスプライシングの中間体ではないかと考察していることは興味深い(WallaceとEdmonds, 1983)。彼らは、まずイントロンの3'スプライス部位に切断が起こった後、3'エキソンが5'スプライス部位に2'-5'結合によって一旦保持されてから、5'スプライス部位の3'-5'結合の切断が起こりイントロンが除去される。その後エキソン連結部の2'-5'結合は3'-5'結合に変換されるというモデル(図2)を考えたのである。

#### f) スプライスソームとスプライシング因子

*in vitro*スプライシング反応の過程でmRNA前駆体は、反応に関与する因子と巨大な複合体を形成することが、グリセロール密度勾配やしょ糖密度勾配遠心法により明らかになった。この複合体は、HeLa細胞では50-60S(Grabowskiら, 1985; FrendeweyとKeller, 1985)、酵母ではやや小さい40S(BrodyとAbelson, 1985)の沈降係数を持っており、スプライスソームと名付けられた。スプライスソームはスプライシング反応の起こる場であると考えられているが、その理由として、スプライスソームにはスプライシング反応の中間体である2種のRNA、即ち5'エキソンと、3'エキソンの付いたラリアット型イントロンが局在していること、スプライシング反応と同じくスプライスソームの形成がATP依存性であること、また、スプライシング反応を阻害するような処理、例えば抽出液をsnRNP(後述)に対する抗体で処理したりすると、同時にスプライスソーム形成も阻害されることなどがあげられる。*in vitro*スプライシングでみられる反応の遅滞時間の少なくとも一部分は、このスプライスソームの形成に要する時間であろうと考えられている。

スプライシングに関与する因子は、現在までにいくつか明らかになっている。最も代表的なものはsnRNPである。真核細胞の核内に存在する低分子RNA(small nuclear RNA, snRNA)は、いくつかのタンパク質と複合体を形成していて、核内低分子RNA/protein複合体、すなわちsnRNPと呼ばれている。核内に多量(細胞当たり $10^5 - 10^6$ 分子)に存在する主要なsnRNPにはU1-U6の6種がある。この他に存在量の比較的少ないマイナーなsnRNP(U7-U10)

が同定されている。これらのsnRNPのRNA成分 (snRNA) は、鎖長60-200ヌクレオチドであり、U6RNA 以外の5'末端には特徴的な2,2,7-trimethylguanosineを持つキャップ構造が存在する。snRNP の蛋白成分については、B,B',D,E,F,Gと呼ばれる互いに抗原性 (Sm抗原) の非常に近い6種のポリペプチドが主要なsnRNP に共通に存在する。この6種の蛋白の他にU1RNP にはA,C,68K という3種のポリペプチドが、U2RNP にはA',B'の2種のポリペプチドが特異的に含まれる。他のRNP にも特異的な蛋白成分が存在すると思われるが同定されていない。U4とU6は RNA間の塩基対形成によって一つの複合体 (U4/U6snRNP) を形成していることが明らかになっている (Green の総説, 1986)。

主要なsnRNP の内、核小体に存在しリボゾームRNA のプロセッシングに関与していると考えられているU3RNP を除いた5種のRNP は、スプライシングに関与することが分かってきた。U1snRNA の5'末端がスプライス部位と相補的な配列を持っていることから、U1snRNP が両方のスプライス部位を近傍に保持することによってスプライシングに関与するというモデル (図3) が理論的に考えられていた (Lernerら, 1980; RogersとWall, 1980) が、後にこのモデルは半分だけ (5'側だけ) 正しいことが分かった。U1snRNP を特異的に認識する抗体 (anti-U1) は *in vitro* スプライシング反応を阻害する (Padgettら, 1983b)。また、U1RNA の5'末端部に相補的な合成DNA とRNaseHを用いて核抽出液中のU1RNA を選択的に破壊すると、その抽出液はスプライシング活性を失う (Kramerら, 1984)。これらからU1がスプライシングに関与することが確実となった。高度に精製したU1RNP は、5'スプライス部位に選択的に結合する (Mountら, 1983; Tateiら, 1984) ことから5'スプライス部位の認識に関わっていると考えられる。U1RNA と5'スプライス部位間の塩基対形成が重要であることが次のような *in vivo* の実験で証明された。5'スプライス部位に塩基置換変異を持つアデノウイルスE1A遺伝子はHeLa細胞にトランスフェクションしてもスプライシングを受けないが、この変異した5'スプライス部位との相補性を回復するような塩基置換をU1RNA 遺伝子に導入して、これを変異E1A遺伝子と共にトランスフェクションするとE1A遺伝子のスプライシングが多少とも回復した (ZhuangとWeiner, 19

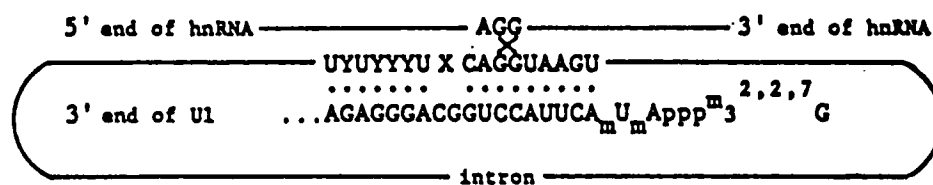


図 3. Lernerらが考えた mRNA スプライシングに U1 RNA が関与するというモデル (Lerner ら, 1980)。

Lerner らは、イントロンの両末端部と U1 snRNA の 5' 末端部が相補的であることに注目して、U1 RNA が両側のスプライス部位を近傍に保持することに関与しているのではないかと考えた。

86)。また、Aebiらは、5' スプライス部位の位置がU1RNA との塩基対形成の安定性によって決定されることを *in vitro*系を用いて明確に示した (Aebiら, 1987; WeberとAebi, 1988)。

U1RNA の場合と同様に、相補的合成DNA とRNaseHを用いて抽出液中の特定のsnRNA を破壊する実験から、U2,U4およびU6RNAが、スプライシングに必要であることが明らかにされた (BergetとRobberson, 1986; BlackとSteitz, 1986)。それ以前にU2がスプライシングに関与するモデルがいくつか考えられていた。Ohshima らはかつて、U2RNA がエキソン部分との塩基対形成により両スプライス部位を近傍に保持するという、LernerらのU1モデルと類似したモデルを提出した (Ohshimaら, 1981)。また、ブランチ部位の存在が明らかになった頃、KellerとNoonはU2RNA がブランチ部位配列と相補的であることに注目し、U2がブランチ部位に結合すると考えた (KellerとNoon, 1984)。実際、U2RNP はスプライスソーム形成の初期にブランチ部位にATP 依存的に結合することが明らかになっている (Black ら, 1985)。この意味で、細胞内でU2RNA がhnRNA と塩基対を形成しているという1982年の報告は注目に値する (Calvetら, 1982)。3' スプライス部位については、U5RNP が結合すると示唆されたが (Chabotら, 1985)、その後、U5RNP に結合していると思われる7-10万ダルトンの蛋白質が単独で3' スプライス部位に結合することが示された (Taziら, 1986; GerkeとSteitz, 1986)。しかし最近、U2のブランチ部位への結合を助けるU2AFという因子が同定され、U2のブランチ部位への結合に先だって3' スプライス部位に結合することが示された (Ruskinら, 1988)。また、hnRNP 蛋白 (後述) のいくつかが3' スプライス部位付近のピリミジンに富む領域に結合するという報告もあり (Swanson とDreyfuss, 1988)、3' スプライス部位を認識する因子については百家争鳴の状態である。

mRNA前駆体を含む核内不均一RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA) は、細胞内ではいくつかの蛋白と複合体を形成していて (hnRNP)、電子顕微鏡で観察すると、複数のビーズがRNAの糸の上に付いたような形 (beads on a string) をしている。この構造はイントロンの有無に関係なくみられることから、スプライスソームと同一のものではないと思われる。このビーズ

構造は、コア蛋白 (core protein) と呼ばれる 6 種の蛋白 (A1, A2, B1, B2, C1, C2) から構成されている。C 蛋白に対する単クローン抗体で、スプライシングを阻害するものが得られたという報告がある (Choiら, 1986)。しかし、*in vitro* スプライシング系に外から加えられた mRNA 前駆体は、スプライシング反応が起こるまでの遅滞時間中にその二次構造が ATP に依存して解きほぐされ、その解きほぐし反応は C 蛋白に対する抗体で阻害される、という報告 (Wollenzienら, 1987; Goswamiら, 1987) から考えると、これら hnRNP のコア蛋白は、スプライシング反応そのものに関与しているというよりも、スプライスソーム形成時においてスプライシング因子がスプライス部位へ結合するのに必要な mRNA 前駆体の二次構造の解きほぐし反応に関与することによって間接的にスプライシングに関係していると考えられることもできる。しかし、hnRNP 蛋白に対するポリクローン抗体は、スプライスソーム形成が起こった後に反応系に加えても反応を阻害するという報告があり (Sierakowskaら, 1986)、hnRNP 蛋白が 3' スプライス部位付近に結合するという報告と合わせると、反応への直接関与の可能性もあると思われる。

我々のグループでは、後述するように、キャップ構造がスプライシング反応に積極的な役割を果たしているという結果を得ており、核内のキャップ構造認識因子がスプライシング反応に何らかの関与をしていると考えている (Ohnoら, 1987)。

他に、HeLa細胞抽出液をカラムクロマトグラフィーで分離し、スプライシング活性を再構成することによって、いくつかのスプライシング因子が同定されているが、因子が多数であるため、この方法で全ての因子を同定することはかなり困難であることが分かってきた。Hurwitz らのグループは、DEAE-cellulose と Bio-Rex 70 カラムを用いてスプライシング活性を 3 つの分画 I a, I b, II に分け、そのうち I b と II の 2 つを再構成すると、スプライシング反応の第一段階だけが起こること、II には核酸を含む因子 (snRNP) が存在すること等を示した (Furneauxら, 1985; Perkinsら, 1986)。Krainer と Maniatis は、スプライシング活性を 5 つの分画に分け (SF1, SF2, SF3, SF4A, SF4B)、SF1, SF2, SF4B の 3 つは反応の第一段階に必要で、SF3 と SF4A は第二段階にのみ必要であることを報告した (Krainer と Maniatis, 1985)。スプライ

シング活性の分画を最も精力的に行っているKellerのグループは、高速液体クロマトグラフィーを用いて、2つのsnRNP分画と4つの非snRNP分画(SF1-4)を同定した(Kramerら, 1987; Kramer, 1988)。しかし彼らは、反応の第一段階で働く因子と第二段階で働く因子を明確に分離することには成功していない。各グループで同定された因子の間の関係は現在のところは不明である。各分画が単独のスプライシング因子しか含んでいないことを証明することは非常に困難であるし、snRNPのような因子はそもそも多数の因子の複合体であるので、このような生化学的な方法論ではスプライシング因子の厳密な数を推定するのは不可能であろう。これに対し酵母では、多数のスプライシングの高温感受性突然変異株が分離され、10種の異なる相補群(rna2-11)が同定されている(Hartwell, 1967; Hartwellら, 1970)。これらの突然変異株から調製された抽出液のスプライシング活性は高温感受性であり、異なる変異株の抽出液を混合するとスプライシング活性が相補されることが明らかになった(Linら, 1987)。この遺伝学と生化学を組み合わせた方法論は今後スプライシング因子の同定に強力な武器となることは疑いない。

スプライスソームそのものを精製してその構成成分を調べようという試みもいくつか行われた。GrabowskiとSharpは、ビオチン化したmRNA前駆体上にスプライスソームを形成させ、それをストレプトアビジンアフィニティークラムを用いて精製し、その中にU2, U5, U4/U6snRNAが含まれるがU1は含まれていないと報告した(GrabowskiとSharp, 1986)。BindereifとGreenは、同様の方法でスプライスソームを精製しU2, U5, U4/U6の他にU1RNAも含まれていると主張した(BindereifとGreen, 1987)。Reedらは、ゲル濾過クロマトグラフィーによりスプライスソームを精製しその電子顕微鏡写真を撮ることに成功したが、彼らもやはりU1RNAが含まれていると報告した(Reedら, 1988)。このような違いが生じた原因は、1)U1のスプライスソームへの結合が非常に弱く精製の過程で離れてしまう、あるいは、2)実際U1は特定の段階でスプライスソームから解離するためにその前後でスプライスソームの構成成分に違いが生じる、等の可能性が考えられる。後で述べるように、Sharpのグループは、U1RNPは5'スプライス部位を認識した後にmRNA前駆体から解離すると考えているが、スプライスソームはU1に特異的な蛋白に対する抗体で効

率よく免疫沈降させることができるという報告がある (BindereifとGreen, 1986; Abmayrら, 1988) ので、あるいはRNA だけが解離するのかも知れない。このU1の問題は未だ決着がついていない。snRNP 以外のどのような蛋白因子がスプライスソーム中に存在するのかは明らかになっていない。また、精製したスプライスソーム分画単独ではスプライシング反応を起こすことは今のところできない。スプライスソームの構成成分の他に、弱く、あるいは短時間だけスプライスソームと接触する蛋白性の因子が必要であることが示唆されている (Abmayrら, 1988)。

これらのスプライスソームの構成成分がどのような順序で集合していくかが調べられた。KonarskaとSharp は、スプライシングのさまざまな段階における複合体を非変性ゲル電気泳動で分画後、それをメンブレンにブロットし、各snRNA に特異的なプローブを用いて複合体中のRNA 成分を調べるという強力な方法を開発し (KonarskaとSharp, 1986)、スプライスソームの形成経路について図4のようなモデルを提出した (KonarskaとSharp, 1987; KonarskaとSharp, 1988; Lamondら, 1988)。すなわち、両スプライス部位がU1とU5(?) によって認識された後、U2がブランチ部位に結合し、スプライスソームの前駆体 (complexA) が形成される。彼らは、この時点でU1RNA が解離していると考えていることは前に述べた。次に、この前駆体に、あらかじめ複合体を形成しているU5, U4/U6が結合し、U2, U5, U4/U6 を含むスプライスソーム (complexB) が形成される。しかし、反応中間体が含まれるスプライスソーム (complexC) にはU4RNA がないことは注目すべきである。U4のスプライスソームからの解離が反応開始の引金になっているのかも知れない。また彼らは、mRNA前駆体がなくてもU2, U4, U5, U6 が複合体をつくりうることを示し (図4)、スプライスソームの基本骨格はsnRNP 同士の相互作用によって説明できると考えている (KonarskaとSharp, 1988)。

#### g) スプライシングにおけるATP 要求性について

スプライシングにはATP が必要である。スプライスソーム形成にATP が必要であることは前にも述べた。スプライスソームが形成されないことにはその後の反応も全く起こらないので、反応の第一段階や第二段階におけるATP



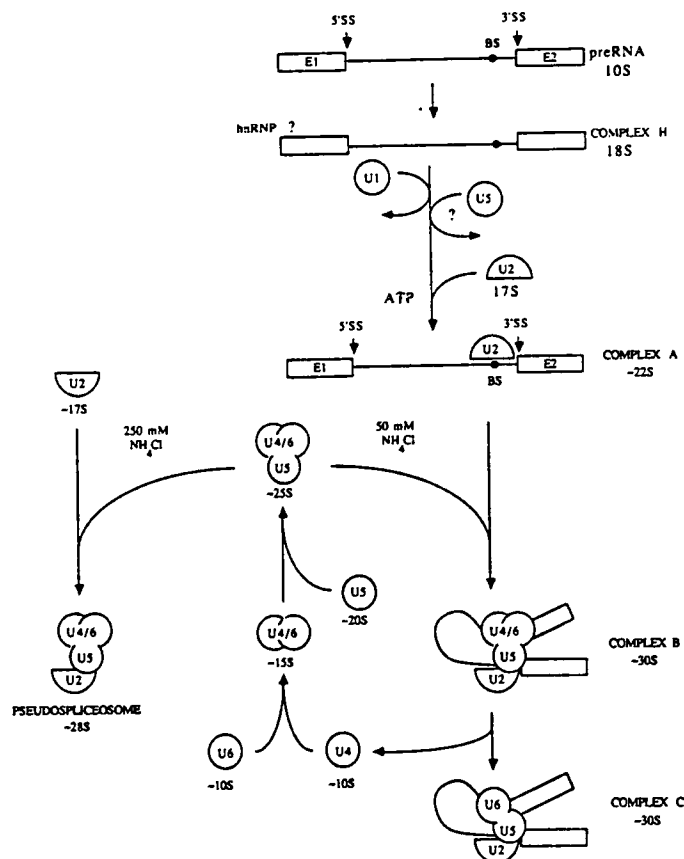


図 4. スプライスソームの形成経路。

この図はKonarskaとSharp の二つの論文 (KonarskaとSharp,1987; KonarskaとSharp,1988) から引用した。両スプライス部位がU1とU5(?) によって認識された後、U2がブランチ部位に結合し、スプライスソームの前駆体 (complex A) が形成される。次にこの前駆体に、あらかじめ複合体を形成しているU5,U4/U6が結合し、U2,U5,U4/U6 を含むスプライスソーム (complex B) が形成される。しかし、反応中間体が含まれるスプライスソーム (complex C) では、U4RNA が既に解離している。また彼らは、mRNA前駆体がなくともU2,U4,U5,U6 が複合体をつくりうることを示し、スプライスソームの基本骨格はsnRNP 同士の相互作用によって説明できると考えている。

の必要性を調べることは困難であった。これを調べるためには、スプライソーム形成、第一段階、第二段階の3つを独立に調べることできる系をつくることが必要であった。Sawaらは、熱処理した抽出液では第二段階に必要な因子(SF3)が失活するために反応の第一段階しか起こらないという以前の発見(KrainerとManiatis, 1985)を利用して、反応の第二段階にATPが必要であることを明確に示した(Sawaら, 1988)。また、Abmayrらは、抽出液を2.5mM EDTAで前処理するとスプライソームは形成されるが反応は全く起こらなくなることを利用して、反応の第一段階にもATPが必要であることを明らかにした(Abmayrら, 1988)。これら諸段階におけるATPの役割は明かではない。

今までに発見されたすべての核酸連結酵素(ligase)はエネルギーを要求する。

後述するように、tRNAスプライシングに関与するRNA ligaseもこの例外ではない。しかし、前述したようにmRNAスプライシング反応はセルフスプライシングイントロン(後述)と同様に、二段階のエステル交換反応によって進行する可能性が高い。とすると反応そのものにはエネルギーは必要ないということになる。では、これらのATPは何のために消費されるのであろうか。考えられる可能性を列挙してみよう。

1. スプライソーム形成において、前述のように、ATPはmRNA前駆体の二次構造の解きほぐし反応に使われる。これに関しては、若干の実験的根拠があることは前に述べた(Wollenzienら, 1987)。
2. スプライシング因子が集合あるいは解離するために何らかの蛋白のリン酸化が起こる必要があるのかも知れない。反応そのものについても蛋白のリン酸化が反応の引金になっている可能性がある。
3. ATPの分解により、ATPを結合しているある因子が構造変換を起こし、それがスプライシング因子の集合や反応の引金を司る。
4. mRNAスプライシング反応はよく似た二つのエステル交換反応によって進行するので、二つの反応とも同一の活性部位で起こる可能性が高い。他方、この二つの反応の起こるmRNA前駆体上の場所は、第一段階はブランチ部位、第二段階は3'スプライス部位と考えられ、両者は近傍とはいえ数十ヌクレ

オチド隔たっている。とすると、反応の第一段階が終わった後、第二段階の反応が起こるためには、反応の活性中心と mRNA 前駆体が相対的に数十ヌクレオチド移動しなければならない。おそらくスプライスソーム自身の構造がゆがむことによって活性中心の移動が行われるのであろうが、スプライスソームが mRNA 前駆体上を短距離だけスライドすることも考えられる。このようなことに ATP のエネルギーが使われるのかも知れない。

これら可能性は相互に排除するものではなく重複しうるものである。どれが正しいのか、または、すべて間違っているのか、を検証するのは今後の課題である。

#### h) スプライス部位の選択における二つの問題

スプライス部位の認識には、大きく分けて二つの問題があると思われる。既に述べたように、スプライス部位の配列にはかなりのあいまいさが許されている。だから、スプライス部位となりうる塩基配列は、実際のスプライス部位以外にイントロン中にもエキソン中にも数多く出現する。この様な偽りのスプライス部位と真のスプライス部位はどのようにして区別されているのだろうか。これが第一の問題である。一つの考え方は、mRNA 前駆体の二次構造等によって特定のスプライス部位だけが使われるという考え方である。Solnick は、安定なヘアピンループの中にあるスプライス部位はしばしば無視されることを示した (Solnick, 1985b)。しかし、偽りのスプライス部位がすべて安定なヘアピンループの中に存在するとは考えにくい。もう一つの考え方は、スプライス部位周辺の配列の今までに認識されていないような特徴が、重要であるという考え方である。Reed と Maniatis は、スプライス部位の認識に、その近傍のエキソン配列が重要であるという実験結果を示した (Reed と Maniatis, 1986)。しかし、エキソン配列中のどの様な構造的特徴が重要であるかを同定することはもちろん示唆することすらできなかったし、ヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子のエキソン配列をそれと非常に相同性の高いマウスのエキソン配列と置き換えても、うまく働かないという新たなパズルを生むことになった。真のスプライス部位を変異によって破壊すると潜在的なスプライス部位が活性化されるという例も多い (Padgett らの総説, 1986; Green の

総説, 1986)。このことから考えると、真のスプライス部位と言っても絶対的なものではなく複数の潜在的スプライス部位の間の競合によってスプライス部位が選ばれると考えるのが正しいのであろう。このスプライス部位間の競合という問題は次の第二の問題とも関連していると思われるので、次に第二の問題に進むことにしよう。

多くの高等真核生物の遺伝子は二つ以上のイントロンを持っている。例えばコラーゲン遺伝子は50個以上ものイントロンによって分断されている。このような遺伝子においては両スプライス部位が50個ずつ存在するが、5'スプライス部位と3'スプライス部位の正しい組合せを保証する機構がなければ、どれかのエキソンが除去されてしまい（エキソンジャンプ）、正しいmRNAができなくなってしまう。スプライシングは両スプライス部位間でランダムに起こり、それによって生じた多種類のmRNAの中から正しいmRNAだけが使われるという考え方が誤りであることは、正しいmRNAの生じる確率を計算してみるとすぐに分かる。n個のイントロンを持つmRNA前駆体から正しいmRNAが生じる確率を考えてみよう。エキソンジャンプがランダムに起こるとすると生成するmRNAの種類数は、両端の二つのエキソンを除くn-1個のエキソンが0個からn-1個までスキップされる場合の数を合計したものである。正しいmRNAはその内の一種類だけであるから、正しいmRNAの生じる確率は、

$$P(n) = 1 / \sum_{k=0}^{n-1} C_k^{n-1}$$

である。n=50のときは  $P(50) = 2 \times 10^{-15}$  となり、限りなく0に近い。また、実際、後述するように *in vitro*系においてもエキソンジャンプは通常の状態では起こらないことが分かっている（Solnick, 1985b; Ohnoら, 1987）。どのようにして両スプライス部位の正しい組合せが選択されるのかというのが第二の問題である。この機構を説明しようとするモデルがいくつか考えられた。これらのモデルは大きく三つのカテゴリーに分けられる。一つめは、最も単純なモデルである。スプライシング反応そのものがもともと決まったスプライス部位の組同士でしか起こりえないと考えるのである（Sharp, 1981）。しかし、ChuとSharpは、SV40の初期遺伝子の第一エキソンと、マウスβ-グロビン遺伝子の第三エキソンを持つキメラ遺伝子が細胞内で正

確にスプライシングを受けることを示し、異なるイントロンに由来するスプライス部位同士がcompatibleであることを明かにして、このモデルを否定した (ChuとSharp, 1981)。二つめは、スプライシング反応は基本的にはどの5' と3' スプライス部位の組でも起こりうるが、RNAの二次構造によって正しい組が決められるというモデルである。Trapnellらは、イントロンが安定な二次構造を取ることによって正しいスプライス部位同士が近傍に保持されるというモデルを提示した (Trapnellら, 1980)。また、筆者は、 $\delta$ -クリスタリン遺伝子のエキソン配列の3'部分とそのすぐ下流のイントロンの3'付近の配列が相補的であることに注目し (図5)、これらの相補性がスプライス部位の正しい組合せを決定しているというモデルを考えた (Ohnoら, 1985)。変わったモデルとしては、ヒストン遺伝子にはイントロンがないこととヒストンmRNAにはポリ(A)配列が付加されないことの関連性に着目して、両スプライス部位付近の配列とポリ(A)配列が安定なRNA三重鎖を形成することによって正しいスプライス部位の組が選択されるというモデル (図6)もある (Binaら, 1980)。しかし、これらの二次構造モデルはいずれも実験的根拠は全くない。第三のカテゴリーは、最も魅力的なscanning modelである (Lewin, 1980; Sharp, 1981)。このモデルでは、例えばまず5' スプライス部位が認識された後、ある因子がイントロン配列上を3'に向けてスキャンして行き、一番近い3' スプライス部位を捜し出すというような機構を想定するのである。このモデルを実験的に検証しようという試みがいくつか行われた。LangとSpritzは、ヒト $\gamma$ -グロビン遺伝子のイントロンの5' スプライス部位あるいは3' スプライス部位を重複させた場合どちらのスプライス部位が選択されるかを調べたところ、常に最も近傍のスプライス部位の組が選ばれることから、scanning modelは正しいと考えた (LangとSpritz, 1983)。しかし、Kuhneらは、ウサギ $\beta$ -グロビン遺伝子を用いて同様の実験を行い、必ずしも近傍のスプライス部位の組が選ばれるわけではないというscanning modelに反する結果を得た (Kuhneら, 1983)。その後、ReedとManiatisは、*in vitro*系を用いてスプライス部位の重複実験を詳細に行い、上述した矛盾する二つの実験結果を統一することに成功した (ReedとManiatis, 1986)。彼らは、"スプライス部位の強さ"と"スプライス部位の近傍

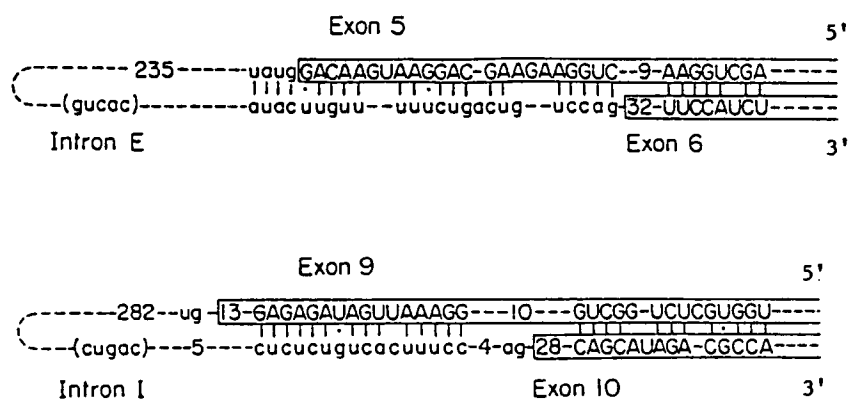


図 5.  $\delta$ -クリスタリン遺伝子にみられるエキソン・イントロン間の相補性 (Ohnoら, 1985)

エキソンの3'末端部の配列とすぐ下流のイントロンの3'末端部の配列の間に相補性がみられる。相補性が最も顕著なエキソン5とイントロンE間、およびエキソン9とイントロンI間の例を示した。

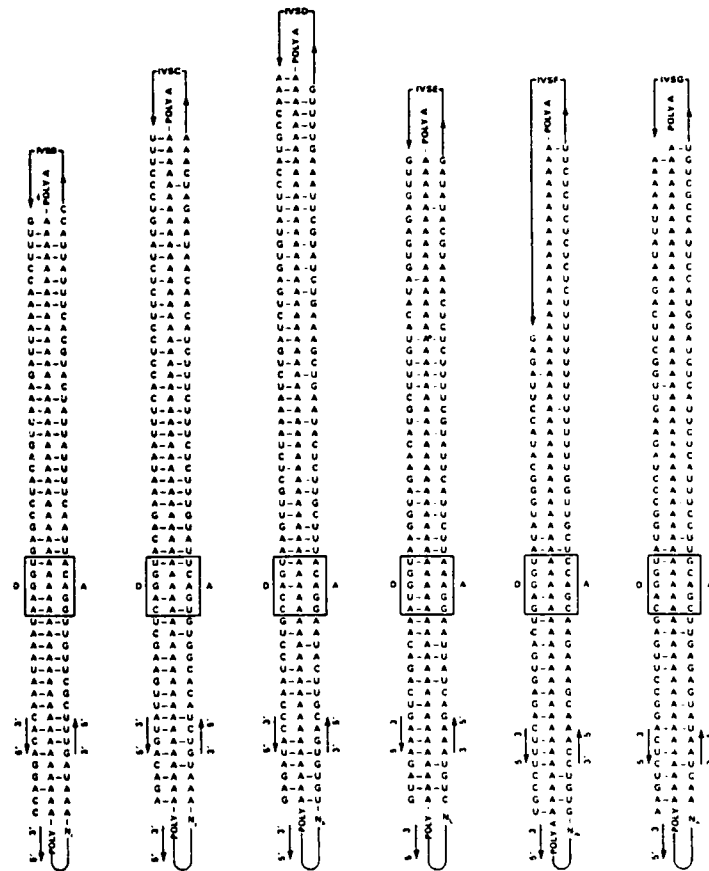


図 6. ポリ A 配列が mRNA スプライシングに関与するというモデル (Bina ら, 1980) .

ポリ A 配列と両スプライス部位付近の配列が、安定な RNA 三重鎖を形成し、両スプライス部位を近傍に保持するというモデル。ニワトリオボアルブミン遺伝子の 6 個のイントロン (イントロン B - G) の例を示す。D 及び A はそれぞれ、5' 及び 3' スプライス部位を表している。

性”という二つの要素でスプライス部位が選択されると考えた。すなわち、同じ強さのスプライス部位が重複している場合は、近傍のスプライス部位が選択されるが、近傍のスプライス部位が弱く遠方のスプライス部位が強い場合は、遠方が選択されることもある。”スプライス部位の強さ”はスプライス部位そのものの配列だけでなく、隣接するエキソンの配列の量によって決まる。LangとSpritzの場合は、重複させたスプライス部位が充分量のエキソン配列を持っていたので常に近傍のスプライス部位の組が選ばれたが、Kuhneらの場合は近い方のスプライス部位のエキソン配列の量が充分ではなかったので、そのスプライス部位は無視され遠方のスプライス部位が選ばれたと考えるのである。このように考えるとこれらの実験結果はすべてscanning modelと矛盾しない。このモデルにおいてはスプライス部位の選択における二つの問題がどちらも説明されているという点で画期的なモデルであると思われるが、エキソン配列の特徴とは一体何なのか等、不明な点もある。Solnickは、scanning modelに関連して、イントロン内をRNA鎖に沿って移動する(intron tracking)因子があるかどうかを次のような方法で調べた。彼は、イントロンの中央部にたったひとつのC残基しか含まないようなmRNA前駆体の鋳型を人工的に作成し、この鋳型を用いてビオチン化CTP存在下で転写反応を行うことにより、イントロンの中央部にたったひとつのビオチン化C残基を含むmRNA前駆体を調製した。このmRNA前駆体のC残基のところにビオチン-アビジン複合体を形成させると、逆転写酵素はこの位置でストップするにもかかわらずスプライシングは阻害されなかった(Solnick,1987)。この結果は、RNA鎖に沿ってのintron tracking因子の存在を強く否定するものである。このように第二の問題についても、明解なモデルは今の所ないと言わざるを得ない。

#### i) Alternative SplicingとTrans Splicing

上述のように如何なる機構が関与しているかは不明であるが、複数のイントロンを持つmRNA前駆体においては、隣合わないエキソン同士が途中のエキソンをスキップして連結してしまうような(エキソンジャンプ)ことは、通常は起こらない。しかし、このエキソンジャンプを積極的に利用して自らの



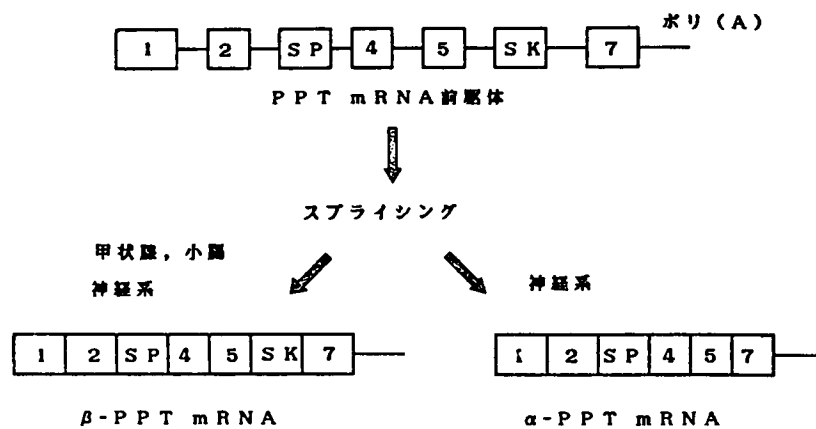


図7. PPT mRNA前駆体のalternative splicing (Nawaら, 1984).

SP及びSKは、それぞれサブスタンスPとサブスタンスKをコードするエキソンを表している。甲状腺や小腸では正常なスプライシングが起こり $\beta$ -PPT mRNAが産生されるのに対して、神経系ではSKエキソンがスキップされ $\alpha$ -PPT mRNAが産生される割合が多くなる。

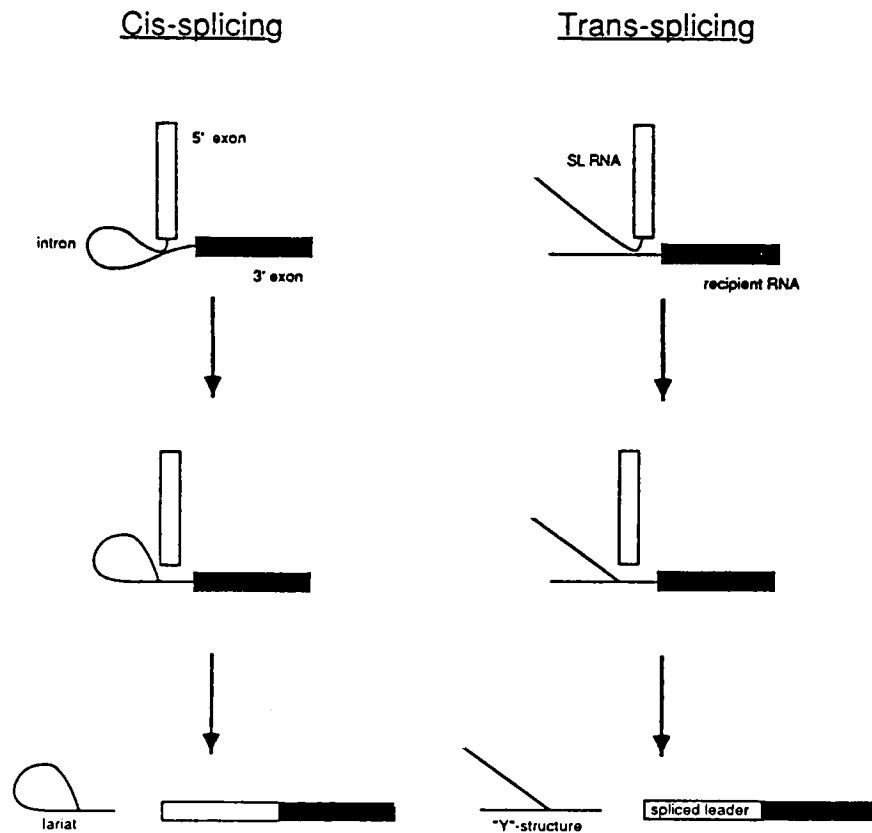


図 8. Cis-splicingで生じるラリアット型イントロンとTrans-splicingで生じるY字型イントロン。

この図はBlumenthalとThomasの総説（1988）から引用した。

産物の多様性を増している遺伝子も多数ある。例えば、サブスタンスP やサブスタンスK 等の神経ペプチドをコードする牛のプレプロタキキニン (PPT) 遺伝子では、サブスタンスK をコードする6番目のエキソンをスキップするかどうかで、図7の様に二種類のmRNAを産生する (Nawaら, 1984)。しかも、この二種類のmRNAの産生は、組織特異的な調節を受けていて、甲状腺や小腸では、ほとんどのmRNA前駆体がエキソンジャンプを起こすことなく正常にスプライシングされるのに対して、神経系では、エキソンジャンプを起こす割合の方が多くなる。PPT 遺伝子の他にも、異なる組織や発生段階で、異なるスプライス部位が選択され、1つの遺伝子から複数種のmRNAが産生される例 (alternative splicing) が多数報告されている (LeffとRosenfeldの総説, 1986)。極端な例として、トロポニンT 遺伝子の場合は、1つの遺伝子から10-64種類ものmRNAが生じることが分かっている。 $\beta$ -グロビンmRNA前駆体に特定の二次構造をとらせるように塩基配列を改変させると、*in vitro* においても*in vivo* においてもエキソンジャンプが起こる事が示されている (Solnick, 1985b)。alternative splicingの機構については、現在のところ明かではないが、mRNA前駆体の二次構造が重要な要素であるかもしれない。

通常のmRNAスプライシング反応は、一続きの連続したmRNA前駆体上で起こると考えられるが、別々のRNA 上にあるエキソン同士がスプライシング機構によって連結されてmRNAを生じるという現象 (*trans* splicing) が知られている。この現象は最初、トリパノソーマという原生動物で発見された。トリパノソーマの全てのmRNAの5'末端部には、共通の35ヌクレオチドの配列 (SL) が存在する。このSL配列はmRNA本体とは別に、その5'端にSLを含む135ヌクレオチドのRNA として転写され、後で*trans* splicingによってmRNA本体に連結されることが明らかになった (Van der Ploegの総説, 1986; Murphyら, 1986, SuttonとBoothroyd, 1986)。このことの強い根拠となったのは、通常のスプライシング反応の産物であるラリアット型イントロンの代わりに、Y字型のRNA が同定されたことである (図8)。最近、線虫 *C.elegans* においても*trans* splicingがあることが分かり、その機構が注目を集め始めた (BlumenthalとThomasの総説, 1988)。ごく最近、*C.elegans* のSLRNA がtrimethylguanosineのキャップ構造を持ち、細胞内でsnRNP (SLsnRNP) と

して存在していることが示唆された (Thomasら, 1988; Bruzikら, 1988)。このSLsnRNPはおそらく、スプライスソームの中において、通常のスプライシングにおけるU1snRNPのかわりを務めることによって、自らを基質にした trans splicing反応に関与するのであろう。トリパノソーマのSLRNAのキャップ構造はtrimethyl Gではなく  $m^7G$ であるが (SuttonとBoothroyd, 1988)、このSLも蛋白と複合体を形成していてRNPとして存在するらしい (BlumenthalとThomasの総説, 1988)。この様な trans splicingが、高等生物においても存在するかどうかは疑問であるが、HeLa細胞核抽出液中でも、通常のmRNA前駆体をイントロンのまん中で切断したような二つのRNA分子が、低い効率ながら trans splicingすることが分かった。また、二つのRNA分子を接着させるような相補的配列をイントロンの中に導入すると、trans splicingの効率が高まることが示された (Solnick, 1985a; Konarskaら, 1985)。

#### j) tRNAのスプライシング

真核生物の核のtRNA遺伝子の多くには、アンチコドンの一塩基下流の位置に短いイントロンが存在する。これらのtRNAのイントロンの除去は、今まで述べてきたmRNAスプライシングとは全く異なり、エンドヌクレアーゼとリガーゼが関与する比較的分かりやすい酵素反応により行われる (Padgettらの総説, 1986)。tRNAのスプライシングは、mRNAスプライシングと異なり、スプライスソームの様な巨大な複合体中で起こるわけではない。このことは、tRNAスプライシングにおいては、イントロンによって分断されている二つのtRNA部分が塩基対合によって安定なtRNA構造をとることができるので、両スプライス部位の切断が起こりイントロンが除去される際に、両エキソンを近傍に保持する機構を考える必要がないことと関係があると思われる。

二つの異なるtRNAスプライシング反応が知られている。一つは酵母や小麦のタイプ、もう一つはHeLa細胞のタイプである (図9)。どちらのタイプも最初の反応は同じで、両方のスプライス部位がエンドヌクレアーゼによって切断されイントロンが除去される。酵母やムギでは、ヌクレアーゼは左側のスプライス部位のヌクレオチドにサイクリックリン酸基を残す。これがサイクリックホスホジエステラーゼにより切断されて3'-OH基を生じる。右

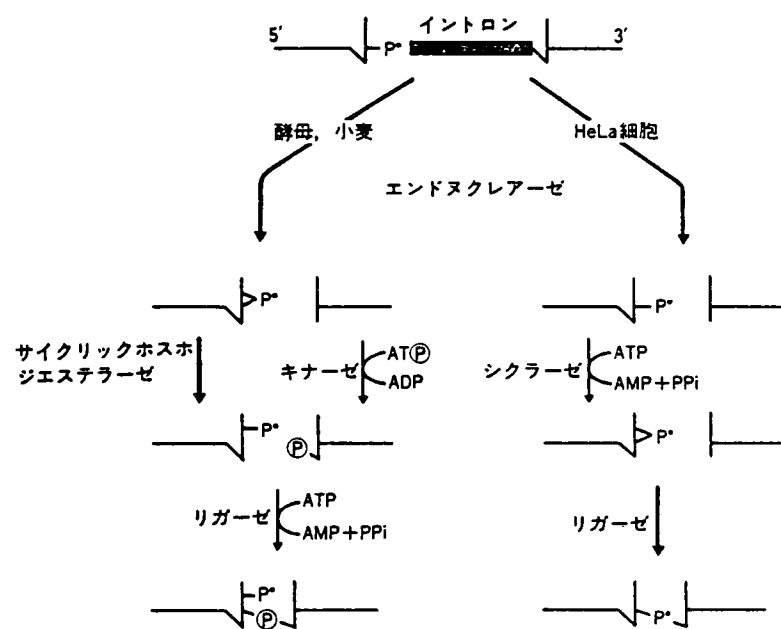


図 9. tRNAスプライシングの反応経路.

スプライス部位のリン酸基は、酵母や小麦では A T P から由来するが、HeLa 細胞では前駆体にもともとあったものである。

側のヌクレオチドは5' - OH基を持っているが、これがATPをリン酸源にしてキナーゼの作用により5' - Pに変換される。そして、3' - OH基と5' - P基がRNAリガーゼにより連結される。これに対して、HeLa細胞においては、エンドヌクレアーゼが3' - Pと5' - OH基を生じる。シクラーゼがATPを分解して、高エネルギーの2' - 3' サイクリックリン酸を産生し、それが5' - OH基と反応して二つのエキソンが連結される。この両者のスプライシング反応の違いは、2' - 3' サイクリックリン酸基と5' - OH基を連結する活性のある珍しいRNAリガーゼを持っているかないかの違いに帰することができる。これらの反応中のエンドヌクレアーゼ以外の酵素活性は、すべてRNAリガーゼの単一ペプチドに担われていることが分かっている。

#### k) Self-Splicing

ミトコンドリアには多くのイントロンが存在するが、それらはイントロン内の塩基配列や二次構造等の共通性によって二つのグループに分類されている。これらグループIおよびグループIIイントロンの構造的特徴はここでは省略するが、これらのイントロンのあるものは、イントロン自体に担われている酵素活性によってセルフスプライシングすることが知られている。グループIおよびグループIIイントロンのセルフスプライシング経路を図10に示した。どちらのスプライシングも二つのエステル交換反応から成っているが、若干の違いがみられる。グループIイントロンのスプライシングはグアノシンを要求する。その反応経路は、まずグアノシンの3' - OH基が求核的に5' スプライス部位を攻撃・切断し、グアノシンはイントロン5' 端に付加される。次に5' エキシソンの3' - OH基が3' スプライス部位を攻撃し、エキソンの連結とイントロンの切り出しが起こるのである。これに対して、グループIIイントロンのスプライシングの場合は、グアノシンは必要なく、外来のグアノシンの3' - OH基のかわりに、イントロン内の3' スプライス部位近傍のA残基の2' - OH基が5' スプライス部位を攻撃し、ラリアット構造を形成するところが異なっている(図10)。グループIIのスプライシング経路は、上に述べてきた核のmRNAスプライシング経路と非常に

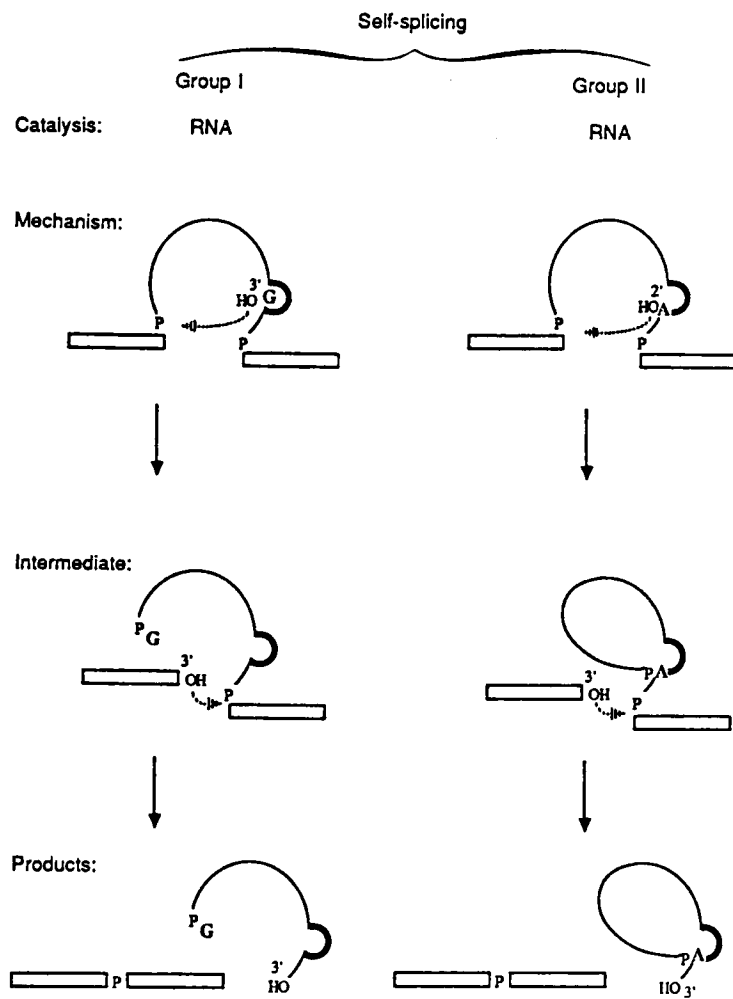


図 10. グループ I イントロンとグループ II イントロンの Self-Splicing 経路の比較.

この図は、Sharp の総説 (1987) より引用した。どちらの反応も二段階のエステル交換反応から成っているが、ステップ 1 の反応の求核的攻撃体 (nucleophile) が、外来のグアノシンであるか (グループ I)、あるいはイントロン内部のアデノシン残基であるか (グループ II) という点が異なっている。

似ている、というよりも、全く同一であることに驚かされる。mRNAのイントロンの進化的原型がグループIIイントロンであることが示唆されている（Cechの総説，1986）。他方、酵母ミトコンドリアのrRNAのイントロンは、グループIの特徴を持っているが、ラリアット構造をつくることが報告されている（Arnbergら，1986）。このことから考えて、グループIイントロンとグループIIイントロンも共通の起源を持つ可能性があると思われる。

### 1) イントロンの起源と進化

イントロンの起源については大きく分けて二つの説がある（Greenの総説，1986；Padgettらの総説，1986）。すなわち、生命が生まれた当初からイントロンは存在したという説と、生命が進化する過程でイントロンの侵入が起こったという説である。ここでこの二つの説について議論しようとは思わない。しかし、Catalytic RNAの発見が、生命の起源とイントロンの起源に対する新しい考え方を可能にした。イントロンの起源と進化に関する次のようなシナリオが考えられる。ある時、原始のスープ中で、ヌクレオチドのランダムな重合反応により産生されたあるRNA配列が、RNA polymeraseの活性を獲得した。このRNAは、自分自身や他のRNAを鋳型として相補的なRNAを合成し、さらにそれを鋳型とすることによって、どんどんコピー数を増やし複製していった。このRNAが、もし回文構造をしていたなら、複製反応は一段階で済んでしまうはずである。このRNA配列は、おそらく同時に、自らを含むRNA配列を切り出す酵素活性（Self-Splicing活性）を獲得した。実際、グループIイントロンが、一種のRNA polymerase活性を持ちうることが示されている（ZaugとCech，1986）。このRNA配列は、セルフスプライシングの逆反応によって他のRNAゲノムに侵入していき、どんどん広がっていった。DNAゲノムが登場してからは、このRNA配列は逆転写によってDNA上に定着し、それがgene conversionによってDNAゲノム上に広がった。一旦広がったこのイントロンは、イントロン内のhomologous recombinationにより、どんどん遺伝子の数を増やしていった。この原始のイントロンはグループIイントロンに近いものであったが、次第に進化して現在のグループIIイントロンに近いものを生み出した。グループIIイントロンの方が新しいと考えた理由は、



保存されている塩基配列がより少ないからである。その後、グループ II イントロンの酵素活性を担ういくつかの RNA motif は次第に独立した小さな RNA に担われるようになり、現在のような mRNA のスプライシング機構に進化してきた。核の tRNA のイントロンおよびそのスプライシング機構は、おそらく上の三種類のイントロンとは全く独立に、しかも比較的最近に（蛋白性の酵素が充分進化してから）出現したように筆者には思われる。イントロンの進化に関連して、スプライソームとリボソームの類似性に着目して、蛋白合成の機構が mRNA スプライシング機構から進化した可能性も論じられている（Sharp の総説, 1987）。

イントロンが長い進化の過程で今まで維持されてきたのはどのような理由によるのだろうか。一般に次のような可能性が考えられている（Green の総説, 1986）。一つめは、イントロンの中で組換えが起こることによってエキソンの混ぜ合わせ（exon-shuffling）が起こり、遺伝子が多様化できるので、進化の上で有利になるという考え方である。この考えは最初 Gilbert によって提示された（Gilbert, 1978）。二つめは、スプライシング機構の進化により生じた alternative splicing の機構の獲得が多細胞生物の進化に必要であったという説である。三つめは、イントロンが、例えばエンハンサーのような調節領域を含んでいるという説である。確かにそういう例もあるが、すべてのイントロンに当てはまるとは考えにくい。四つめは、よく分からない理由によって、イントロンが存在することが遺伝子発現にとって重要であるという考えである。SV40 の初期遺伝子や、ヒトやウサギの  $\beta$ -グロビン遺伝子の充分な発現には、それらの mRNA 前駆体がイントロンを持っていることが重要であると言われている（Green の総説, 1986）。しかし、この説も一般性があるとは思われない。これらの四つの説では、高等生物には何故これほど多くのイントロンがあるのかを説明できないように筆者には思われる。イントロンを除去するという仕事は、実は一般に考えられている程細胞にとって負担ではないので、負の selective pressure がそれほど強くないのかも知れない。いずれにせよ、長い進化の過程を経てきた現在でも、ヒトを含む高等生物の遺伝子の大部分にイントロンが存在し、イントロンは除かれなければならないのである。

### m) 本研究の背景

筆者がmRNAスプライシングの研究を始めた1985年は、in vitroスプライシング系を用いて、スプライシング反応の生化学が怒濤のような勢いで明らかにされていった頃であった。CellやNature等の一流の学術雑誌は、毎号、スプライシングに関する複数の論文で飾られ、それら論文のいくつかはほぼ同じ内容であったりもした。この時点においては、in vitroにおける全ての研究は一つのイントロンを持つmRNA前駆体のスプライシングに関するものであった。筆者は、一つのmRNA前駆体上の複数のイントロンがどのような様式で除去されていくかに興味を持った。それまでのノーザンブロット法を用いたin vivoの解析によって、複数のイントロンの除去には厳密な順序性はないと一般に信じられていたが(Ryffelら,1980; Tsaiら,1980)、複数のイントロンの除去の詳細なキネティクスを調べるにはin vitro系での解析が必要であると思われた。

他方、その当時、mRNA前駆体の5'末端に存在するキャップ構造のスプライシングにおける役割は明確ではなかった。前に述べたように、キャップ構造はin vitroスプライシング反応3-4倍程度促進する(Krainerら,1984)。しかし、キャップ構造はRNAの安定性を高めているに過ぎないのか、あるいはスプライシングに積極的に関与しているのかは明らかではなかった。Konarskaらは、HeLaの全細胞抽出液を用いたスプライシング反応が $m^7GpppN$ 等のキャップ構造類似体によって阻害されるという結果を得て(Konarskaら, 1984)、キャップ構造がスプライシングに関与すると考えたが、最もよく使われているHeLa細胞核抽出液においては、キャップ構造類似体が反応を阻害するというはっきりした結果は得られなかった。(後ほど、EderyとSonenbergは、核抽出液をキャップ構造類似体で前処理するとスプライシングが阻害されることを示した(EderyとSonenberg, 1985))。これらのことを踏まえて、筆者は、複数のイントロンのスプライシングに対するキャップ構造の影響を調べようと考えた。

その当時、我々のグループでは、 $\delta$ -クリスタリン遺伝子由来のmRNA前駆体とHeLa細胞核抽出液を用いたin vitroスプライシング系が坂本らにより既に開発されており、反応産物の同定もほぼ完了していた。そこで、筆者は、

$\delta$ -クリスタリン遺伝子由来の二つのイントロンを同一分子内に持つ人工の mRNA 前駆体を用いて、その二つのイントロンの除去様式、および、それに対するキャップ構造の影響を in vitro 系を用いて詳細に解析することにした。

## 第 II 章 材料と方法

### a) 酵素と試薬

大腸菌RNA ポリメラーゼは、A19株 (RNaseI<sup>-</sup>) から、Nakajimaらの報告 (Nakajimaら, 1982) に従ってhomogeneity近くまで精製した。vaccinia virus guanylyltransferase は、東京大学医科学研究所の水本清久博士から分与していただいた。Micrococcus のヌクレアーゼとプロテイナーゼKは、それぞれベーリンガー・マンハイムとメルクから購入した。SP6 RNA ポリメラーゼや制限酵素等のその他の酵素類は、宝酒造から購入した。

<sup>32</sup>P で標識されたヌクレオチドは、アマシャムから購入した。キャップ構造類似体を含むすべての非標識ヌクレオチドはファルマシアから購入した。その他の試薬類は、主に和光純薬と半井化学から購入した。

### b) プラスミドの作製

プラスミド pSU2と pSU1は (図 1 1)、プラスミド pSE182あるいは pSE181 (Sakamoto, 1986) の AatII-PvuII 0.6KB 断片を、pUC19 の AatII-PvuII 2.0 KB 断片と連結することによって作製した。

mRNA前駆体調製の鋳型に用いたプラスミドは次のように作製した。δ-クリスタリン遺伝子 (Ohnoら, 1985) のエキソン 1 3 からイントロン 0 までを含む EcoRI-HpaII 0.8 KB断片を pSU2ベクターにクローニングし、エキソヌクレアーゼ III を用いた欠失法 (Henikoffら, 1984) によって、エキソン 1 3 からエキソン 1 5 までを含む p δ EX 1 3 - 1 4 - 1 5、エキソン 1 3 からエキソン 1 4 までを含む p δ EX 1 3 - 1 4、およびエキソン 1 4 から 1 5 までを含む p δ EX 1 4 - 1 5 をそれぞれ作製した。これらのプラスミドの塩基配列等の詳細は文献 (Ohnoら, 1985; Sakamoto, 1986) を参照されたい。p δ EX 1 4 - 1 5 ・ 1 3 - 1 4 は、エキソン 1 4 から 1 5 までを含む HindIII-EcoRI 断片をエキソン 1 3 から 1 4 までを含む HindIII-BamHI 断片に連結し、pSU2の HindIII-BamHI 部位に挿入することにより作製した。p δ EX 1 4 - 1 5 Δ N は p δ EX 1 4 - 1 5 のイントロンの SacI と StyI 間の断片を欠失させたものである。p δ EX 1 4 - 1 5 Δ N / 1 4 - 1 5 は、p δ EX

14-15のエキソン14の5'末端部のHindIII部位に、エキソン14、15とイントロンΔNを含むHindIII-KpnI断片を挿入することによって作製した。pδEX14-15/14-15ΔNの場合は、それとは逆にpδEX14-15ΔNに、エキソン14、15とイントロンNを含む断片を挿入した。

#### c) mRNA前駆体の調製

in vitro転写反応に用いた鋳型DNAは、上述したプラスミドを適当な制限酵素で直鎖化することによって調製した。制限酵素は、pδEX13-14、pδEX13-14-15、及びpδEX14-15・13-14の場合にはSmaIを、pδEX14-15、pδEX14-15ΔN、pδEX14-15ΔN/14-15、及びpδEX14-15/14-15ΔNの場合はXmnIを用いた。

大腸菌RNAポリメラーゼを用いたin vitro転写反応は、20 μlの反応系（鋳型DNA 0.5 pmol, 大腸菌RNAポリメラーゼ 35ng, 20mM Tris-Cl pH7.8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 250 μM ATP, 250 μM UTP, 250 μM CTP, 125 μM GTP）で37℃、60分間転写反応を行った。RNAを標識する場合には、[α-<sup>32</sup>P] GTP (410Ci/mmol)を2-5 μl加えた。また、5'末端にキャップ構造等を形成させる場合には、m<sup>7</sup>GpppG等の適当なジヌクレオチドプライマーを1-2 mM加えた。転写反応後、8M尿素を含む5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で主要転写産物を精製した。

#### d.) HeLa細胞からの核抽出液、細胞質S100フラクション、及びリボソーム high salt wash フラクションの調製

HeLa細胞は、0.03% グルタミンと5%馬血清を含むイーグルMEM培地（ニッスイ）を用いて、スピナーフラスコ中で培養し、細胞濃度が4-6 × 10<sup>5</sup>/ml になったら harvestした。

核抽出液及び細胞質S100フラクションはDignamらの方法に準じて調製した（Dignamら, 1983）が、核抽出液の調製には次のような変法を採用した。すなわち、核の沈澱から因子を塩抽出する際に、原法の0.42M NaClのバッファ

ーの代わりに0.6M KClを含むバッファーを細胞  $10^9$  個あたり1.5 ml加えた。

リボソーム high salt washフラクションは次のようにして調製した。細胞質S100フラクションを調製する際の、最後の10万Gの遠心で得られた沈澱（リボソームが含まれる）を細胞  $10^9$  個あたり2 mlのバッファーA（10% glycerol, 20 mM Hepes-NaOH pH7.9, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.2 mM APMSF）にsuspendし、3 M KClを用いて0.6 M KClに調整した。これを4℃で1時間ゆっくりと攪拌した後、10万Gで1時間遠心して得られた上澄み液をリボソーム high salt wash フラクションとした。

#### e) in vitroスプライシング反応

in vitroスプライシング反応は、50  $\mu$ lの反応系（HeLa細胞核抽出液 30  $\mu$ l, 2.6% ポリビニルアルコール500, 20 mM クレアチンリン酸, 0.5 mM ATP, 2 mM  $MgCl_2$ , 1 unit/ $\mu$ l RNase Inhibitor, 約10 fmol(1-3万cpm)のmRNA前駆体)で30℃で行った。所定の時間インキュベートした後、150  $\mu$ lの停止バッファー（150 mM Tris-Cl pH7.5, 18.8 mM EDTA, 225 mM NaCl, 1.5% SDS）と5  $\mu$ lのプロテイナーゼK（20 mg/ml）を加えることにより反応を停止させた。37℃、30分のプロテイナーゼ処理の後、フェノール処理・エタノール沈澱によりRNAを回収し、8M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

#### f) アフリカツメガエル卵母細胞核への微量注入

卵母細胞核への微量注入はGreenらの報告に従って行った（Greenら,1983）。mRNA前駆体の水溶液を、一つの卵母細胞あたり約25 nl（2-3 fmolのmRNA前駆体）注入した。各実験あたり一群20個ずつの卵母細胞に微量注入を行い、注入後20℃でmodified Barth solution（Gurdon, 1976）中でインキュベートした。所定の時間後、卵母細胞を液体窒素で速やかに凍結させた。凍結した卵母細胞は、GTC solution（4 M guanidine thiocyanate, 18 mM sodium citrate, 0.36% sarcosyl, 200 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0）中でよくピペッティングすることにより完全に溶解させた。それをフェノール・クロロホルム処理し、イソプロパノール沈澱を行うことによりRNAを回収

した。

#### g) プローブ RNA の調製

キャップ構造を持つプローブ (57ヌクレオチド長; 比活性は約  $5 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ g) は、制限酵素 EcoRI の切断によって直鎖化したプラスミド pSP64 を鋳型にして、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  GTP (410 Ci/mmol) の存在下で  $m^7\text{GpppG}$  をプライマーとする SP6 RNA ポリメラーゼの転写反応により合成した (Melton ら, 1984)。キャップ構造を持たないプローブは同様の反応系で、プライマーを加えずに合成した。これらの RNA は 8M 尿素を含む 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製し、 $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

#### h) RNA をプローブとするゲル移動度シフト法

検定するフラクションを RNA プローブ (2-5 万 cpm) と混合し、10  $\mu$ l の反応系 (5% glycerol, 10 mM Hepes (pH 7.9), 50-500 mM KCl, 50-1000  $\mu$ g/ml yeast RNA, 0.5 mM DTT, 0.1 mM APMSF) で、 $20^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、この反応混液を 1/4 X TAE バッファー (10 mM Tris-acetate, 0.5 mM EDTA, pH 8.3) で作製した 6% 非変性ポリアクリルアミドゲルに直接 apply した。電気泳動の状態を知るために、色素マーカー (0.05% BPB, 0.05% XC) を別のレーンに apply した。泳動はバッファを循環させながら約 10 V/cm の電圧で行い、色素 BPB が 8-12 cm 移動したら停止させた。ゲルはゲル乾燥機で乾燥させオートラジオグラフィーを行った。

#### i) Capped RNA-Sepharose の調製

Capped RNA-Sepharose は、sequence-specific DNA affinity resin の調製法 (Kadonaga ら, 1986) を RNA に応用して調製した。すなわち、ゲル移動度シフト法で用いたキャップ構造を持つ RNA プローブを反応系のスケールを上げて大量に (300-500  $\mu$ g) 調製し、これを臭化シアンで活性化した Sepharose CL-2B (ファルマシア、ゲル容積 5 ml) に結合させた。文献 (Kadonaga ら, 1986) に従って、未反応の Sepharose を 1 M ethanolamine-HCl (pH 8.0)

で不活性化してから、resin をよく洗い 4 °C に保存した。

#### j) キャップ構造結合蛋白の精製

特に断わらない限り以下の操作は 4 °C で行った。2 x 10<sup>10</sup> 個の HeLa 細胞から調製した核抽出液 (20 ml, 蛋白濃度 23.4 mg/ml) を、バッファー A (10% glycerol, 20 mM Hepes pH7.9, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 1 mM DTT) で平衡化した DEAE-cellulose カラム (ワットマン、2.5 cm x 18 cm) に apply し、カラムを 300 ml の 150 mM KCl-バッファー A でよく洗った。次にカラムを 300 mM KCl-バッファー A で溶出し、4 ml ずつフラクションを集めた。280 nm の波長の吸収が 1.0 以上のフラクションを pool し、DE-300 フラクションとした (36 ml, 蛋白濃度 3.6 mg/ml)。

この DE-300 フラクションに、乳鉢と乳棒を用いて細粉化した硫酸アンモニウム (100 ml あたり 47.6 g: 0 °C における飽和の 75%) をスターラーで混合しながら加え、硫酸アンモニウムが完全に溶解してから氷上でさらに 1 時間静かに攪拌した。タイプ 60 ローター (ベックマン) で 25,000 rpm で 20 分間遠心することにより沈澱を集め、それを 4 ml のバッファー B (バッファー A と同じだが 0.2 mM APMSF を含む) に完全に溶解させた。この溶液を、2 ml の 3 M KCl および 0.5 ml の 50% glycerol と混合してから、1 M KCl-バッファー B で平衡化させた Bio-Gel A 1.5 m カラム (バイオラッド、2.5 x 92.5 cm) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによって分画した。キャップ構造結合活性をゲル移動度シフト法で検定し、活性のあるフラクションを pool した (Bio-A フラクション; 27 ml, 蛋白濃度 414 µg/ml)。これを 50 mM KCl-バッファー A に対してよく透析し、同じバッファーで平衡化した DEAE-Toyopearl 650 M カラム (東洋曹達、ゲル容積 1.8 ml) に apply した。カラムを 10 ml の 50 mM KCl-バッファー A で洗ってから、200 mM KCl-バッファー A で溶出した。0.5 ml ずつフラクションを集め、A<sub>280</sub> が 0.8 以上のフラクションを pool した (DE-Toyo フラクション; 2 ml, 蛋白濃度 3.5 mg/ml)。

10% NP-40 と 0.2 M APMSF を用いて、Toyo-B フラクションを 0.1% NP-40, 0.2 mM APMSF に調整し、バッファー C (200 mM KCl と 0.1% NP-40 を含む バッファー B) で平衡化した 3 ml の capped RNA-Sepharose とチューブの中で混合し、



更に 4 °C で 1 時間ゆっくりと転倒混和した。その後、チューブの内容をバイオラッドの 2 ml ポリプロピレンカラムに移し、40 ml のバッファー C および 40 ml の 700 mM KCl を含むバッファー C で洗った。次にカラムを 4 M 尿素と 200 mM KCl を含むバッファー B で溶出し、0.5 ml ずつ 10 個のフラクションを集めた。活性のあるフラクションを pool し、それを 20% glycerol を含むバッファー B に透析した。この操作によりほぼ homogeneity となったキャップ構造結合蛋白が得られた (1.5 ml, 蛋白濃度 14.4  $\mu$ g/ml)。

#### k) 免疫沈降

免疫沈降実験に用いた血清は次の通りである。

- |                  |                            |                  |
|------------------|----------------------------|------------------|
| 1) 齊藤シズ血清        | anti-U1 RNP                |                  |
| 2) 関谷千恵子血清       | anti-U1 RNP + anti-Sm      |                  |
| 3) 二見幸子血清        | anti-Sm                    |                  |
| 4) 山岡喜代子血清       | anti-U2 RNP (+ anti-U1 痕跡) | (Mimoriら, 1984)  |
| 5) 正常ヒト血清        |                            |                  |
| 6) Y-12          | anti-Sm (単クローン抗体)          | (Lernerら, 1981)  |
| 7) anti-U1 Ag 血清 | anti-U1 RNP                | (Padgettら, 1983) |

1) - 6) は慶応大学医学部の三森経世博士から、6) と 7) は J.A. Steitz 博士からいただいた。

NET-2 バッファー (40 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> 0.05% NP-40, 0.5% DTT) で平衡化したプロテイン A セファロース (ファルマシア) のゲル容積 15  $\mu$ l 分を、エッペンドルフチューブ中で、500  $\mu$ l の NET-2 バッファーおよび 10  $\mu$ l の血清と混合し、さらに室温で 2 時間転倒混和することにより、各抗体をプロテイン A セファロースに結合させた。エッペンドルフチューブの遠心機を用いて、抗体の結合したプロテイン A セファロースを沈澱させ、それを 500  $\mu$ l の NET-2 バッファーで 4 回洗った。この沈澱と 6  $\mu$ l の HeLa 細胞核抽出液および 10  $\mu$ l の NET-2 バッファーを混合し、4 °C で 1 時間転倒混和した。これを遠心分離し、上澄み (sup) は別のチューブに移した。沈澱は 500  $\mu$ l の NET-2 バッファーで 4 回洗った後、30  $\mu$ l の溶出バッファー (1 M KCl, 20 mM Hepes pH 7.9, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM

APMSF )を加えた。これをよく混和し、氷上に5分間置いた後、遠心により上澄みを集めた。この上澄みを免疫沈降したフラクション ( p p t )とした。s u pフラクション 1  $\mu$ l分とp p tフラクション 2  $\mu$ l分のキャップ構造結合活性を、それぞれ、ゲル移動度シフト法で検定した。

RNA プローブの免疫沈降は、上述の操作の中で、HeLa細胞核抽出液をanti-U2 抗体を結合させたプロテインAセファロースと混合する際に、約 40 ngのRNA プローブと 1000 units/mlの RNase Inhibitorを同時に加え、後は同様の操作によりs u pとp p tを得た。s u pおよびp p tフラクションから、プロテイナーースK処理・フェノール処理・エタノール沈澱によりRNA を回収し、それを8M尿素を含む5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画した。

#### 1) UVによる蛋白とRNA のcrosslink

キャップ構造だけが標識された $\delta$  E X 1 4 - 1 5 mRNA前駆体は、非標識の uncapped-mRNA前駆体をvaccinia virus guanylyltransferaseを用いて [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP(410 Ci/mmol)の存在下で cappingすることにより調製した。キャップ構造標識mRNA前駆体 (1-10 万cpm, 20-200 fmol )は、HeLa細胞核抽出液と共に、10  $\mu$ lの*in vitro*スプライシング反応系で30 $^{\circ}$ C・30分間インキュベートした。この反応混液に、氷上で波長254 nmの15ワットUVランプを3 cmの距離から5 - 20分間照射し、蛋白とRNA をcrosslink させた。この反応液を等量の RNase Mix (6 M 尿素, 50 mM EDTA, 1 mg/ml RNase A, 500 U/ml RNase T1)と混合し、37 $^{\circ}$ Cで1 - 4時間インキュベートした。この試料を等量のSDS サンプルバッファー (125 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 0.002% BPB)と混合し、95 $^{\circ}$ C2分間熱した後、10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Laemmli,1970)により分画した。ゲルはintensifying screen を用いてオートラジオグラムをとった。

### 第 III 章 実験結果

#### 第 1 節. mRNA スプライシング反応に対するキャップ構造の影響:

##### in vitro スプライシング系による解析

##### a) mRNA 前駆体の調製

大腸菌の supB-E tRNA オペロンのプロモーターを用いた効率の良い in vitro 転写系が我々のグループにより開発された (Sakamoto, 1986; Sakamoto ら, 1987)。すなわち、supB-E オペロンのプロモーター領域を含む DNA 断片 (237 塩基対) と、ターミネーター領域を含む DNA 断片 (103 塩基対) をプラスミド pBR322 に導入し、この二つの DNA 断片の間に M13mp18 のマルチクローニング配列を更に挿入した。しかし、この様にして作成したプラスミド pSE182 はプラスミド DNA 調製の収率が非常に悪いことが分かったので、このプラスミドの pBR322 の部分を、高コピープラスミドである pUC19 と置き換えたプラスミド pSU シリーズ (図 1 1) を作成した。そして、この pSU2 プラスミドのマルチクローニング部位に、 $\delta$ -クリスタリン遺伝子 (Ohno ら, 1985) の様々なエキソン・イントロン部分を含む DNA 断片をクローン化した。これらのプラスミドは適当な制限酵素 (XmnI あるいは SmaI) で切断することにより直鎖化し、精製した大腸菌 RNA ポリメラーゼを用いた in vitro 転写反応の鋳型として用いた。RNA 転写物は、反応系に [ $\alpha$ - $^{32}$ P GTP] を加えることにより標識した。キャップ構造を持つ RNA は、RNA を vaccinia virus guanylyltransferase により酵素的に capping するか、あるいは、転写反応系に m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G をプライマーとして加えることにより調製した。これらの mRNA 前駆体は 8M 尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製し、in vitro スプライシング反応に使用した。この第 1 節において使用した 4 種の mRNA 前駆体を図 1 2 に模式的に示した。4 種の RNA 共、その 5' および 3' 末端部には、プラスミド由来の短い非クリスタリン配列を含んでいる。mRNA 前駆体の調製に用いた鋳型 DNA の作成や、mRNA 前駆体の調製等の詳細は、第二章 (材料と方法) に示した。

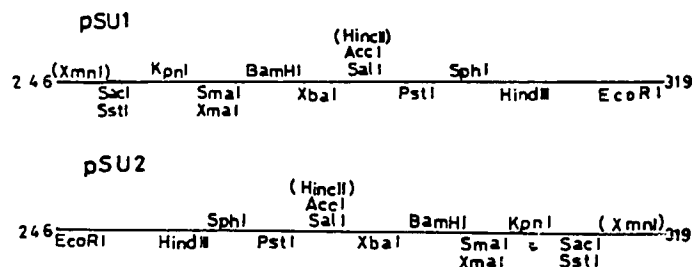
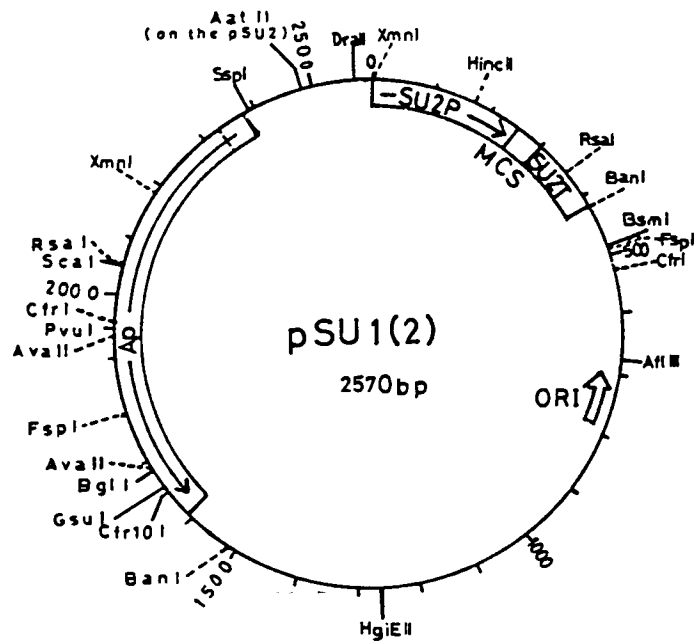


図 1 1. プラスミド pSU シリーズ.

図のSU2P及びSU2Tは、それぞれ大腸菌の supB-E tRNA オペロンのプロモーター及びターミネーター配列を表す。図の下側には、pSU1及びpSU2のマルチクローニング配列 (MCS) の制限酵素部位を示した。

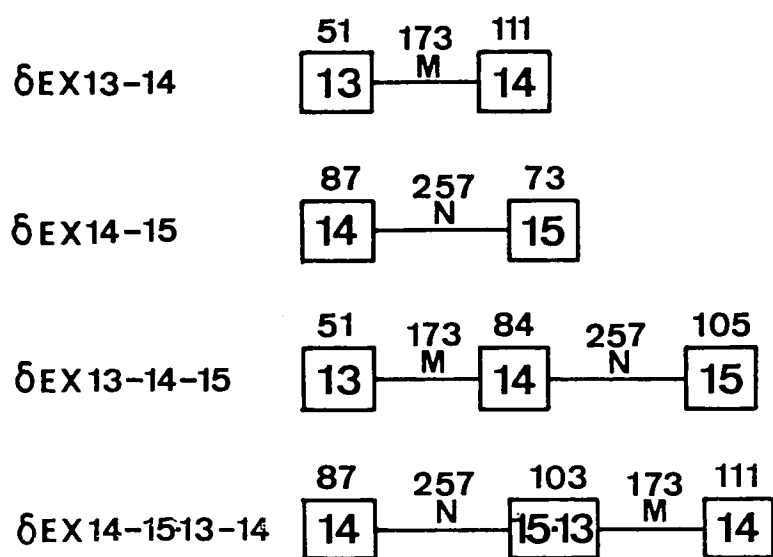


図 1 2. mRNA前駆体の模式図。

ボックスはエキソン配列を、ボックスの間の直線はイントロン配列を表す。ボックスの中の数字と直線の上のアルファベットは、それぞれ $\delta$ -クリスタリン遺伝子 (Ohnoら, 1985) の特定のエキソンとイントロンを表している。各mRNA前駆体の左端が5'末端である。各エキソン・イントロンの長さを各々の上に数字 (ヌクレオチド長) で示した。

#### b) 二つのイントロンを同一分子内に含む mRNA 前駆体の in vitro スプライシング

クリスタリン遺伝子の二つのエキソン 14 と 15、およびその間の一つのイントロンを持つ mRNA 前駆体である  $\delta$  EX 14-15 は、HeLa 細胞核抽出液中で正確に、効率よくスプライシングを受け、ラリアット型イントロン等を含むその反応中間体は他のグループの報告したものと基本的に同様であることが既に明らかになっていた (Sakamoto, 1986)。

図 12 に示した mRNA 前駆体の内、分子内に単一のイントロンしか持たない  $\delta$  EX 13-14 と  $\delta$  EX 14-15 は、その 5' 末端にキャップ構造を持つ場合には、HeLa 細胞核抽出液とインキュベートすると図 13 の A と B に示すように効率よくスプライシングを受けることが確認された。これらの mRNA 前駆体のスプライシングは、キャップ構造がない場合にも起こるが、その効率はキャップ構造を持つ場合に比べて約 1/4 程度に低下することが分かった (データは示さず; 図 21 の b 参照)。

二つのイントロンを持つ  $\delta$  EX 13-14-15 mRNA 前駆体の場合は、非常に多くの反応産物が生成し、複雑なゲルパターンがみられた (図 13 C)。これら多くのバンドに対応する RNA 分子の構造は、その RNA のサイズと、それぞれのエキソンあるいはイントロンに特異的な RNA プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーション等により同定した (データは示さず; Sakamoto, 1986)。これらの RNA の構造は図 13 C の右側に模式的に示した。これらの RNA の構造は、一つのイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライシングにおいてみられた産物を二つのイントロンの場合に適用することによってすべて説明できるものである。図に示すように、三つのエキソンが正確に連結されたスプライシングの最終産物が 60 分で効率よく産生されていることが分かる。また、エキソン 13 と 15 がエキソン 14 をスキップして連結してしまったような産物は検出できなかった。

#### c) 二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライシングに対するキャップ構造の影響

mRNA 前駆体を調製する際の転写反応系に、プライマーとして  $m^7$ GpppG ある

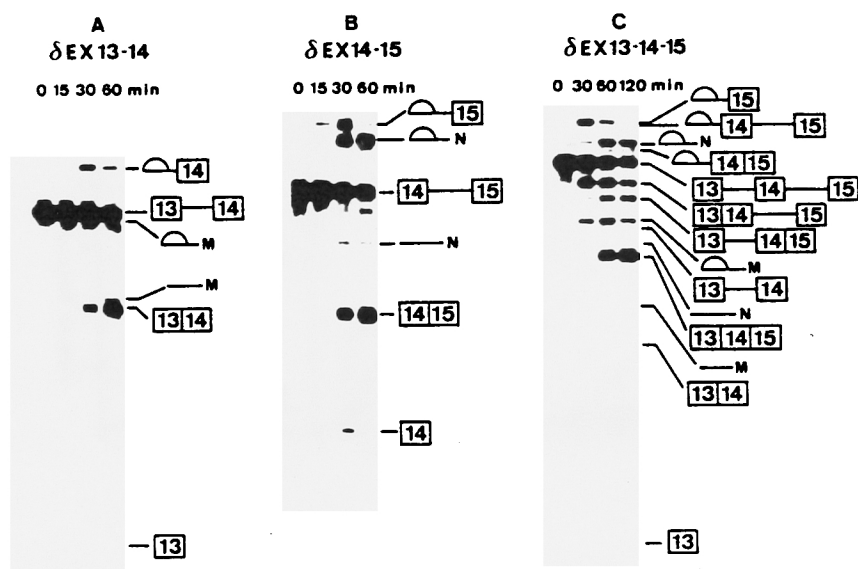


図 13.  $\delta EX 13-14$  (A)、 $\delta EX 14-15$  (B)、及び  $\delta EX 13-14-15$  (C) mRNA前駆体の in vitro スプライシング。

[ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] GTP で標識された各 mRNA 前駆体 ( $m^7\text{GpppG}$  をプライマーとして合成) を、HeLa 細胞核抽出液中において  $30^\circ\text{C}$  で、レーン上に示した所定の時間インキュベートした。RNA 産物を 8M 尿素を含む 6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し、オートラジオグラムをとった。各 RNA 産物の構造は図の右側に模式的に示した。

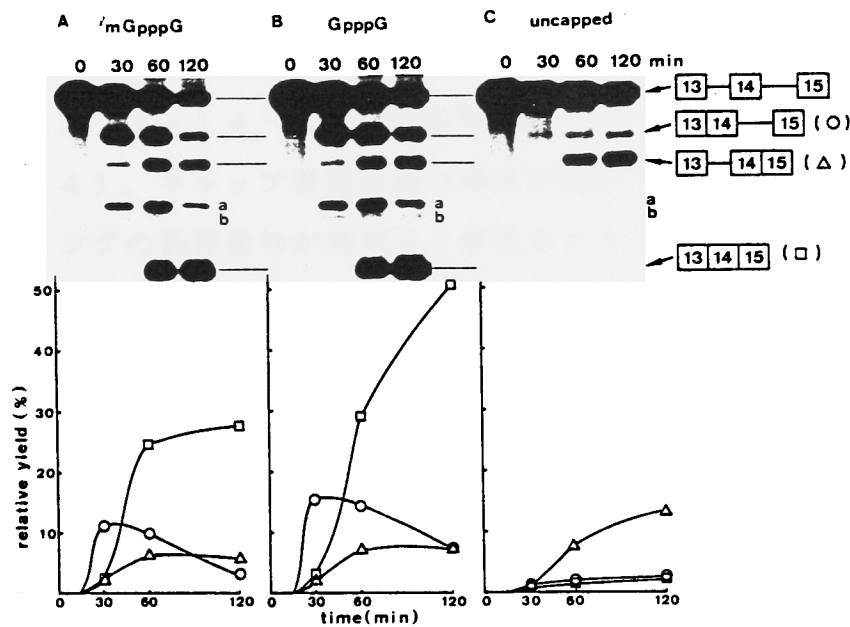


図 1 4. 異なる 5' 末端構造を持つ  $\delta$  E X 13 - 14 - 15 mRNA 前駆体の *in vitro* スプライシング反応のキネティクス。

各 mRNA 前駆体は、 $m^7$ GpppG (A) か GpppG (B) をプライマーにして、あるいはプライマーなしで (C) 合成し、*in vitro* スプライシング反応に使用した。各 mRNA 前駆体のスプライシング反応のオートラジオグラム的一部分 (mRNA 前駆体から最終産物までの間) だけを示した。バンド a はラリアット型のイントロン M であり、バンド b はエキソン 13 とイントロン M 及びエキソン 14 を含む直鎖型 RNA である (図 1 3 C を参照)。図に示す三種の RNA 分子に相当するバンドをゲルから切り出し、その放射活性を Cerenkov 光で測定し、反応に添加した mRNA 前駆体に対するモル比をプロットしたものを図の下側に示した。丸印は上流側イントロンだけが除去された中間体、三角印は下流側イントロンだけが除去された中間体、そして四角印は最終産物を表す。



いはGpppGを加えることによって、それぞれ、通常のタイプ0のキャップ構造あるいはメチル基のないキャップ構造を持つmRNA前駆体を作成することができる。プライマーを加えない場合は、5'三リン酸を持つ、すなわちキャップ構造を持たないmRNA前駆体が合成される。これら異なる三種類の5'末端を持つ $\delta$ EX13-14-15 mRNA前駆体の*in vitro*スプライシングを比較した(図14)。キャップ構造を持つ場合には三つのエキソンが連結されたスプライシングの最終産物が効率よく産生された。メチル基のないキャップ構造を持つmRNA前駆体の場合でも、メチル基を持つキャップ構造の場合と同様に効率よくスプライシングが起こっており、両者のゲルパターンに差がみられないことから(図14AとB)、末端のグアノシンの7位のメチル基はスプライシングに影響しないように思われた。しかし、キャップ構造を持たないmRNA前駆体の場合は、そのスプライシング反応は極端に阻害され、最終産物はほとんど産生しなかった(図14C)。

図14にみられる様々なRNA分子の中に、二つのイントロンの内どちらか一方だけが除去されたような二種類の中間体RNA分子が存在する。 $\delta$ EX13-14-15のスプライシングにおいては、キャップ構造が存在する場合には、上流のイントロンだけが除去されたRNA(RNA Aと呼ぶ)は30分でかなりの量が産生され、その後はしだいに減少していく(図14AとB)。三つのエキソンが連結した最終産物の量は、このRNA Aの減少と呼応するかのよう増加していく様に見える。下流のイントロンだけが除去されたRNA分子(RNA Bと呼ぶ)は、RNA Aに比べてかなり遅れて出現し、60分以降は量の増減はほとんどなく、ほぼ同じレベルに留まっている。キャップ構造を持たない $\delta$ EX13-14-15の場合には、RNA Bの産生はやや増加するのに対して、RNA Aの産生と最終産物の産生は同時に極端に減少した(図14C)。最終スプライシング産物が生成する経路については、RNA Aを介する経路とRNA Bを介する経路の二つが考えられる。しかし、キャップ構造を持たない場合にRNA Aと最終産物の生成が同時に阻害されたことから、最終産物に到る主な経路はRNA Aを介する経路であることが示唆された。このことは、後で述べるキャップ構造類似体による阻害実験によっても支持された。

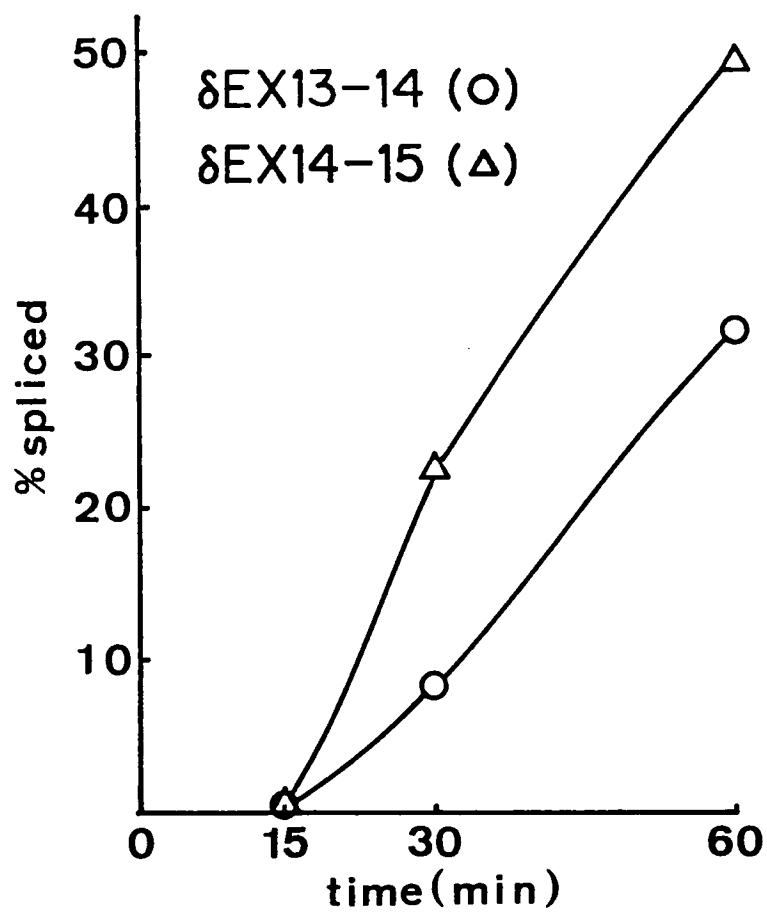


図 1 5.  $\delta EX13-14$  と  $\delta EX14-15$  mRNA 前駆体のスプライシング効率の比較.

$m^7GpppG$  をプライマーにして合成した  $\delta EX13-14$  と  $\delta EX14-15$  mRNA 前駆体の、in vitro スプライシング反応によって産生された連結エキソンを、図 1 4 と同様に定量しプロットした。

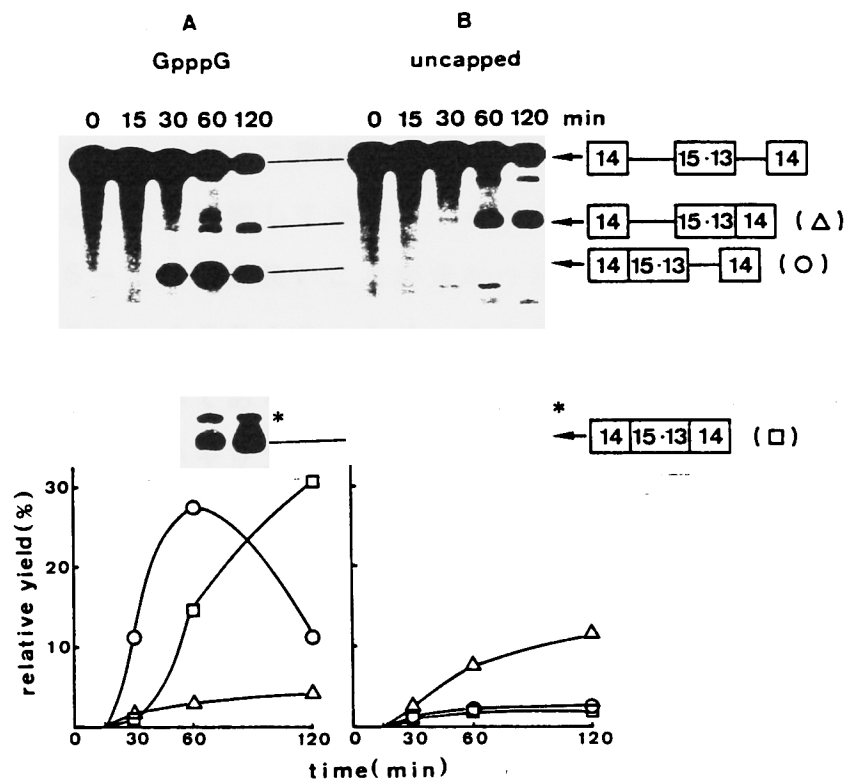


図16. 異なる5'末端構造を持つ $\delta$ EX14-15-13-14 mRNA前駆体のin vitroスプライシング反応のキネティクス.

GpppG をプライマーとして (A)、あるいはプライマーなしで (B) 合成した $\delta$ EX14-15-13-14 mRNA前駆体のスプライシング反応を、図14と全く同様に解析した。

この $\delta EX 13-14-15$  mRNA前駆体から得られた結果は、キャップ構造が上流側のイントロンのスプライシングを促進するが、下流側のイントロンの除去にはほとんど影響を与えないということを示唆している。従って、mRNA前駆体がキャップ構造を持つ場合には上流側のイントロンの方が下流側より効率よく除去されることが考えられる。しかしながら、上流側のイントロンの方が下流側より効率よく除去されるのはイントロン固有のスプライシング効率が上流側のイントロンの方が元々良いからであるとも考えることもできる。 $\delta EX 13-14-15$ の二つのイントロンの固有のスプライシング効率を、各イントロンを単独に持つ二種類のmRNA前駆体（ $\delta EX 13-14$ と $\delta EX 14-15$ ）を用いて比較してみると、 $\delta EX 14-15$ のイントロンの効率の方が1.5-2倍程度良いことが分かった（図15； 図13のAとBを参照）。さらに、 $\delta EX 13-14-15$ の二つのイントロンの位置を前後逆にしたmRNA前駆体である $\delta EX 14-15 \cdot 13-14$ のスプライシングを調べてみると、キャップ構造を持つ場合にはやはり上流側のイントロン（エキソン14と15の間のイントロン）の方が下流側のイントロン（エキソン13と14の間のイントロン）よりも効率よくスプライシングを受けることが分かった（図16A）。mRNA前駆体がキャップ構造を持たない場合には、上流側イントロンのスプライシングは極端に阻害され、同時に最終産物の産生も阻害された。これに対して、下流側のイントロンのスプライシングはキャップ構造のない時でもある程度の効率で起こっている（図16B）。すなわち、二つのイントロンの位置を前後逆にしても全く同様の現象がみられることが明らかになった。また、このmRNA前駆体の場合もエキソンジャンプ産物はやはり検出できなかった。

このように、キャップ構造を持つ $\delta EX 13-14-15$  mRNA前駆体のスプライシングにおいてみられた、上流のイントロンが下流側に比べて効率よく除去されるという現象は、二つのイントロンの固有のスプライシング効率の違いによるものではなく、5'末端のキャップ構造に対する二つのイントロンの相対的位置関係によるものであることが明らかになった。

d)  $\delta EX 13-14-15$  mRNA前駆体のスプライシングのキャップ構造類

## 似体による阻害

序論で述べたように、HeLa細胞核抽出液の*in vitro*スプライシング反応は、全細胞抽出液の場合と異なり、 $m^7GpppG$ や $m^7GTP$ 等のキャップ構造類似体の反応系への添加によってほとんど阻害されなかった。しかし、最近、核抽出液をこれらのキャップ構造類似体とあらかじめpre-incubateしておくと、スプライシング反応が阻害されるという報告が出された（EderyとSonenberg, 1985）。

キャップ構造が $\delta EX 13-14-15$ の上流のイントロンのスプライシングにだけ影響するのであるから、二つのイントロンの内上流のイントロンのスプライシングだけがキャップ構造類似体によって阻害されるかどうかを調べることにした。HeLa細胞核抽出液を $m^7GpppG$ あるいは $GpppG$ とあらかじめ $30^\circ C$ 、15分間pre-incubateした後に、 $\delta EX 13-14-15$  mRNA前駆体を用いてスプライシング反応を行った。図17Aのa-cに示すように、mRNA前駆体がキャップ構造を持つ場合には上流側イントロンのスプライシング（RNA Aの産生）は程度の差はあれ、どちらのジヌクレオチドによっても阻害されるのに対して、下流側イントロンのスプライシング（RNA Bの産生）は全く影響されなかった。 $m^7GpppG$ により阻害された時には、反応産物のゲルパターンは、キャップ構造を持たないmRNA前駆体の場合と全く区別がつかなくなる。この結果は、キャップ構造を持たないmRNA前駆体のスプライシング産物の核抽出液中の安定性は、キャップ構造を持つ場合の安定性とほぼ同程度であることをも示している。キャップ構造を持たないmRNA前駆体のスプライシングに対しては、キャップ構造類似体は何の影響も与えなかった（図17Aのd-f）。また、上流側イントロンのスプライシングの阻害と共に、三つのエキソンの連結した最終産物の産生が阻害されることから、最終産物は主にRNA Aを介して産生されるという考えがさらに裏付けられた（このことの詳しい議論は考察の章で行った）。

二種類のジヌクレオチドの内、 $m^7GpppG$ の方が $GpppG$ よりもはるかに阻害効果が高いことが分かった（図17Aのbとcを比較せよ）。実際、 $8 \mu M$ の濃度においては、 $m^7GpppG$ はスプライシング反応を効果的に阻害するが（図17B）、 $GpppG$ の場合は全く影響しない（データは示さず）。このこと

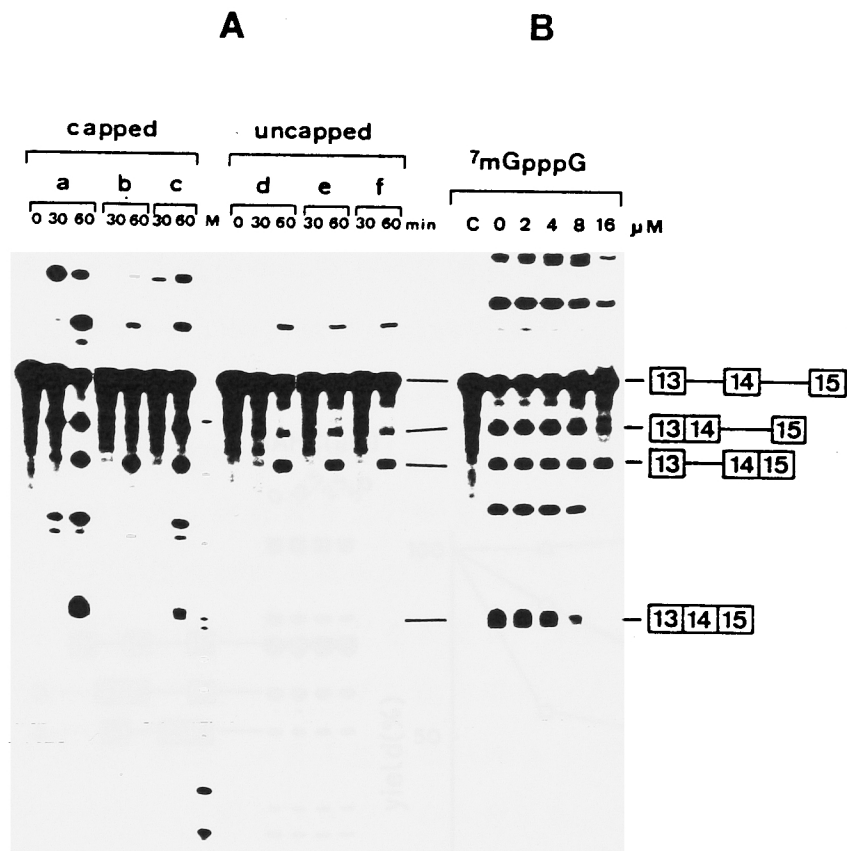


図 17.  $\delta$  E X 13 - 14 - 15 mRNA前駆体の *in vitro* スプライシング反応のキャップ構造類似体による阻害。

HeLa細胞核抽出液をキャップ構造類似体存在下で  $30^{\circ}\text{C}$ ・15分間pre-incubateしてから、mRNA前駆体を加えてスプライシング反応を行わせた。(A) GpppG をプライマーにして合成した mRNA 前駆体 (レーン a - c)、あるいはプライマーなしで合成した uncapped mRNA 前駆体 (レーン d - f) を用いた。レーン a と d は、キャップ構造類似体なしで pre-incubate した対照。レーン b と e は、 $50\text{ }\mu\text{M}$  の  $\text{m}^7\text{GpppG}$  存在下で pre-incubate した。レーン c と f は、 $50\text{ }\mu\text{M}$  の GpppG 存在下で pre-incubate した。レーン M は、HpaII で切断したプラスミド pBR322 である。(B) レーンの上に示すような様々な濃度の  $\text{m}^7\text{GpppG}$  存在下で pre-incubation を行った後、GpppG をプライマーとして合成した mRNA 前駆体を加え、60分インキュベートした (C のレーンだけはインキュベーションなし)。

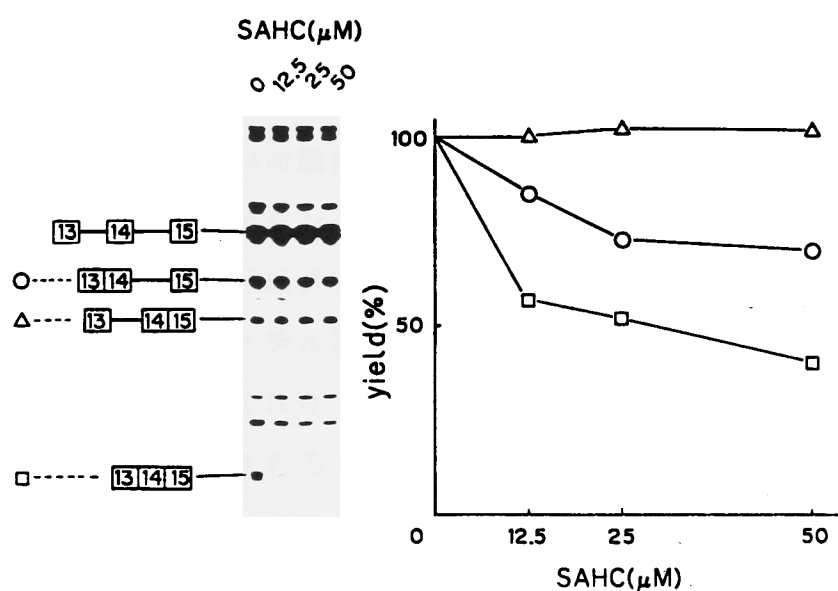


図 18. メチル基のないキャップ構造を持つ  $\delta$  E X 13 - 14 - 15 mRNA 前駆体の *in vitro* スプライシング反応に対する S-adenosyl homocysteine (SAHC) の影響。

GpppG をプライマーとして合成した mRNA 前駆体を用いて、レーンの上に表示するような様々な濃度の SAHC 存在下でスプライシング反応を 60 分間行わせた。図の右側に、各 SAHC 濃度における三種類の RNA 産物の産生量の、SAHC 非存在下の場合に対する比率 (%) をプロットした。

はキャップ構造の末端のグアノシンの7位のメチル基がスプライシングに重要であることを強く示唆している。この結果は、mRNA前駆体のキャップ構造の末端のグアノシンの7位にメチル基がなくても効率よくスプライシングが起こるという図14の結果と矛盾しているように思われる。しかし、この矛盾は、mRNA前駆体のメチル基を持たないキャップ構造は*in vitro*スプライシング反応の際に核抽出液中でメチル化を受けると考えれば説明がつくと思われる。実際、メチル基のないキャップ構造のグアノシンの7位は、メチル基の供与体であるS-adenosyl methionine(SAM)を加えなくても核抽出液中で30℃で速やかにメチル化されることが、末端解析の結果明らかになった(データは示さず; Sakamotoら,1987)。もし7位のメチル基がスプライシング反応に重要であれば、次の様なことが期待される。すなわち、メチル基のないキャップ構造を持つmRNA前駆体のスプライシングにおいて、メチル基の供与体であるSAMはスプライシングを促進し、SAMの競合阻害剤であるS-adenosyl homocysteine (SAHC)はメチル化を阻害するのでスプライシングを阻害するはずである。実際、メチル基のないキャップ構造を持つ $\delta$ EX14-15のスプライシング反応(30℃、60分)は、33 $\mu$ MのSAMの添加によって約1.5倍程度促進される(データは示さず; Sakamotoら,1987)。また、図18に示すように、メチル基のないキャップ構造を持つ $\delta$ EX13-14-15のスプライシング反応系(30℃、60分)にSAHCを添加すると、最終産物とRNA Aの産生は阻害されるが、RNA Bの産生は影響を受けない。50 $\mu$ MのSAHC存在下では最終産物とRNA Aの産生はそれぞれ40%と70%に低下するが、RNA Bの産生は全く変化しない。これらの結果はキャップ構造の末端のグアノシンの7位のメチル基がスプライシングに重要であること、さらにキャップ構造は単にmRNA前駆体を安定化するという消極的な役割だけでなくスプライシング反応において積極的な役割を担っていることを明確に示している。メチル基のないキャップ構造類似体であるGpppGが弱いながら阻害効果を持つ理由は明かではないが、このGpppGも核抽出液中でメチル化されてからはじめて阻害効果を持つ可能性が充分考えられる。もしそれが正しいなら、GpppGはSAHC存在下では阻害効果を失うはずであるが、このような実験は今のところ行ってはいない。また、RNA Bの産生は、キャップ構



造類似体によっても、SAHCによっても阻害されないことから、キャップ構造に依存しないスプライシング反応によるものと考えられる。

## 第2節. mRNAスプライシング反応に対するキャップ構造の影響:

アフリカツメガエル卵母細胞核への微量注入法による解析

### a) 5'末端にアデノシン残基をblocking nucleosideとして持つmRNA前駆体の作成

いままで述べてきた*in vitro*スプライシング系におけるキャップ構造の効果が、*in vitro*系だけではなく実際の細胞内のスプライシング反応においてもみられるかどうかは非常に重要な問題である。このことを明らかにするためにはmRNA前駆体を細胞核内に微量注入してそのスプライシングのタイムコースを調べることが必須である。通常の動物細胞では注入したRNAを解析するためには多数(数百から千)の細胞に微量注入する必要があるため、スプライシング反応のタイムコースを調べることは事実上不可能である。このような目的にはアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の卵母細胞が適している。しかし、卵母細胞核へmRNA前駆体を微量注入することによってスプライシングにおけるキャップ構造の効果を調べることには一つの大きな障害があった。序論で述べたように、キャップ構造を持たないmRNA前駆体は卵母細胞核内で速やかに分解されるため(Greenら, 1983)、キャップ構造を持つmRNA前駆体と持たないmRNA前駆体のスプライシング反応を比較することが困難であるという点である。この問題点を克服するためには、キャップ構造を持たないmRNA前駆体のように振舞い、しかも卵母細胞核内で安定なmRNA前駆体を作成する必要がある。キャップ構造を持たない、5'三リン酸の末端を持つmRNA前駆体が卵母細胞核中で不安定な理由は、5'→3'エキソヌクレアーゼの攻撃を受けるからであると考えられるので、キャップ構造とは異なった5'-5'のblocking構造を持っている様なmRNA前駆体を作成すれば良いはずである。メチル基のないグアノシンをblocking nucleosideとして持つmRNA前駆体では、グアノシンの7位がHeLa細胞核抽出液中と同様に卵母細胞核中でもメチル化を受け、通常のキャップ構造に変換されてしまう可能性が充分考えられるので、blocking nucleosideとしてアデノシンを持つmRNA前駆体を作成することにした。大腸菌supB-Eオペロンのプロモーターと精製した大腸菌RNAポリメラーゼを用いる*in vitro*転写系にプライマーとしてm<sup>7</sup>Gp

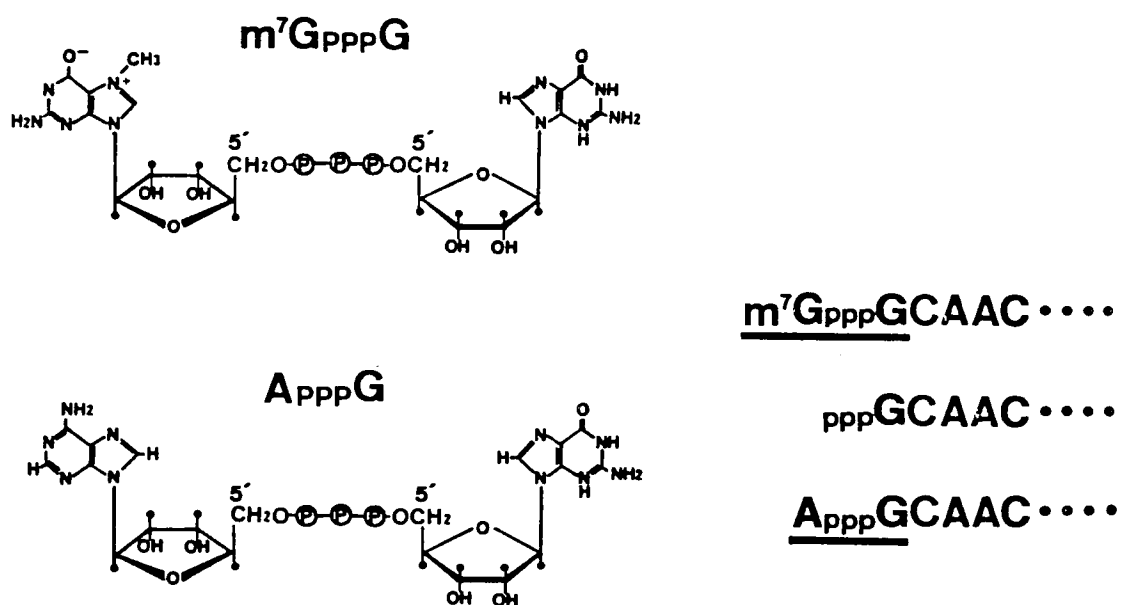


図 19. 異なる 5' 末端を持つ mRNA 前駆体の合成.

二種類のジヌクレオチドプライマー、m<sup>7</sup>GpppG と ApppG の構造を示した。図の右側には、上から、m<sup>7</sup>GpppG をプライマーとした場合、プライマーのない場合、そして ApppG をプライマーにした場合にそれぞれ合成される RNA の 5' 末端部を模式的に示した。

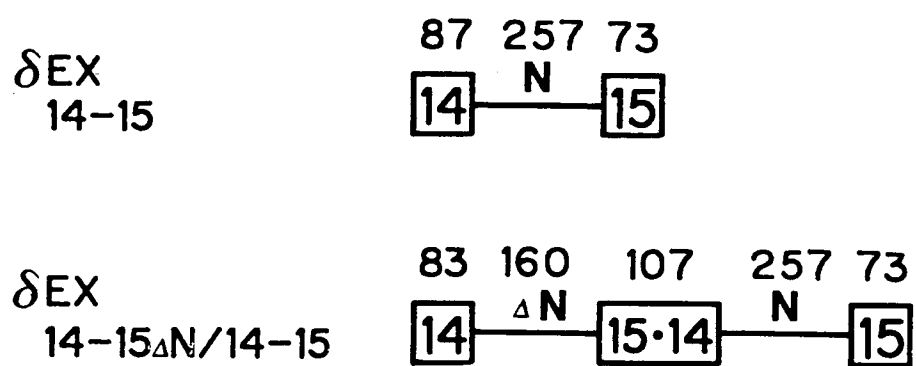


図 20. mRNA前駆体の模式図

第二節の実験で用いた mRNA 前駆体を、図 12 と同様に模式的に表した。

ppG を添加すると、既に述べたように $m^7G$  を blocking nucleoside とするキャップ構造を持つRNA が合成される。この転写系の転写開始点の塩基はG であるので、プライマーとしてApppG というジヌクレオチドを添加したときはアデニンを blocking nucleoside として持つRNA が合成されるはずである（図19）。

卵母細胞核への微量注入実験に用いた mRNA 前駆体を図20に模式的に表した。 $\delta EX 14-15$  mRNA 前駆体を ApppG をプライマーとして合成しその末端を解析すると、合成されたRNA の約7割がアデニンを blocking nucleoside として持っており、残りの約3割は、ApppG によるプライミングが起こらなかった結果生じた5'三リン酸を持っていた。この mRNA 前駆体は卵母細胞核中で非常に安定であり、20℃、40分のインキュベーションで約20%が分解されるだけであった。このRNA の約30%が5'三リン酸を持っていることと、5'三リン酸を持つ uncapped RNA は同じ条件で60-70%が分解されることを併せて考えると、アデニンを blocking nucleoside として持つ mRNA 前駆体そのものはこの条件ではほとんど分解されていないと考えられる（データは示さず）。

#### b) アフリカツメガエル卵母細胞核内における $\delta EX 14-15$ mRNA 前駆体のスプライシングに対するキャップ構造の効果

$m^7G$  あるいはA を blocking nucleoside として持つ二種類の  $\delta EX 14-15$  mRNA 前駆体を調製し、その *in vitro* スプライシングを比較してみた。これ以後、 $m^7G$  あるいはA を blocking nucleoside として持つ mRNA 前駆体を、便宜上それぞれ  $m^7G$ -mRNA 前駆体あるいはA-mRNA 前駆体と呼ぶことにする。図21bに示したように、A- $\delta EX 14-15$  mRNA 前駆体においても、 $m^7G$ - $\delta EX 14-15$  mRNA 前駆体と同様に HeLa 細胞核抽出液中で正確にスプライシングを受けることが分かったが、そのスプライシング効率は  $m^7G$ -mRNA 前駆体の場合の  $1/3-1/4$  程度に低下していた。A-mRNA 前駆体のスプライシング効率は5'三リン酸を持つ uncapped mRNA 前駆体と同程度であり、A を blocking nucleoside として持つ偽キャップ構造はキャップ構造としては機能していないことが示唆された。また、二つのイントロンを同一分子内に含む mR

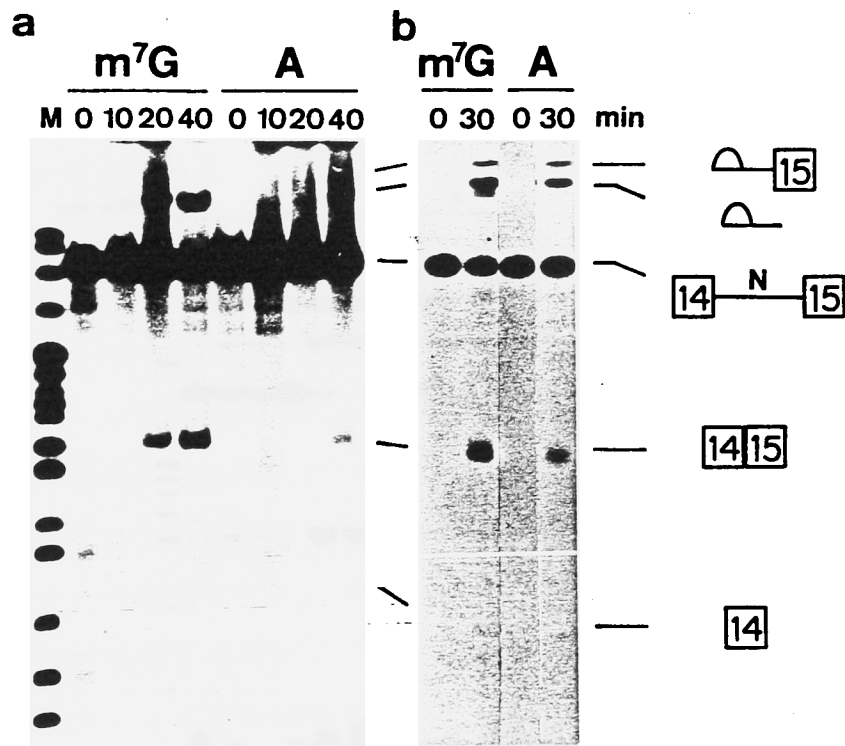


図 21. 異なる 5' 末端構造を持つ  $\delta$  EX 14-15 mRNA 前駆体のスプライシング反応.

$\delta$  EX 14-15 mRNA 前駆体を  $m^7$ GpppG あるいは ApppG をプライマーとして合成した。レーンの上の  $m^7$ G あるいは A は、それぞれの mRNA 前駆体を表している。(a) mRNA 前駆体を卵母細胞核に微量注入し、各レーン上に示した時間 20 °C でインキュベートした後、卵母細胞から全 RNA を抽出した。(b) 各 mRNA 前駆体を、HeLa 細胞核抽出液中で、30 °C・30 分間インキュベートした。RNA 産物を 8M 尿素を含む 6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画し、オートラジオグラムをとった。レーン M は、HpaII で切断したプラスミド pBR322 である。

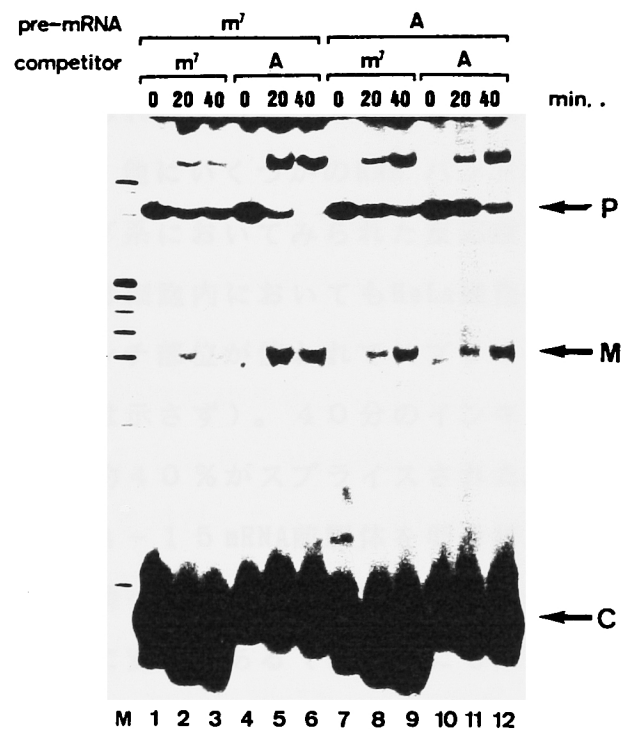


図 2 2. 卵母細胞核に微量注入された  $\delta$  E X 1 4 - 1 5 mRNA 前駆体のスプライシング反応に対する competitor RNA の影響.

competitor RNA は、(材料と方法) に述べた方法で合成した。m7G-mRNA 前駆体 (レーン 1 - 6) あるいは A-mRNA 前駆体 (レーン 7 - 12) を、モル比にして約 70 倍の m7G-competitor (レーン 1 - 3 とレーン 7 - 9) あるいは A-competitor (レーン 4 - 6 とレーン 10 - 12) と共に、卵母細胞核に微量注入して、そのスプライシングを図 2 1 a と同様に解析した。

NA前駆体の in vitro スプライシングにおいても、後に示すように A-mRNA 前駆体のスプライシングパターンは uncapped mRNA 前駆体の場合と全く同一であり、A-mRNA 前駆体は HeLa 細胞核抽出液を用いた in vitro スプライシング系においては uncapped mRNA 前駆体のように振舞うことが明らかになった。

$^{32}\text{P}$  で標識した  $\text{m}^7\text{G}-\delta\text{EX}14-15$  mRNA 前駆体をアフリカツメガエル卵母細胞核に微量注入し、注入後一定時間  $20^\circ\text{C}$  でインキュベートした後、その卵母細胞を液体窒素を用いて凍結させた。凍結卵母細胞から（材料と方法）に述べた方法で RNA を抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画した。図 21a にみられるように、20 分後には二つのエキソンが連結された産物が検出された。他にいくつかの RNA バンドがみられたが、それらは in vitro スプライシング系においてみられた反応産物と同一のものであり、アフリカツメガエル卵母細胞内においても HeLa 細胞核抽出液の場合と同一のスプライス部位やブランチ部位が使われてスプライシングが起こっていることが分かった（データは示さず）。40 分のインキュベーションで、注入された  $\text{m}^7\text{G}$ -mRNA 前駆体の約 40 % がスプライスされた。

次に、A- $\delta\text{EX}14-15$  mRNA 前駆体を卵母細胞核に微量注入し、RNA 産物を上と同様にして調べた。A-mRNA 前駆体は卵母細胞核中で  $\text{m}^7\text{G}$ -RNA と同等かあるいはそれ以上に安定である（後述）にもかかわらず、そのスプライシング効率は低く、 $\text{m}^7\text{G}$ -mRNA 前駆体の 1/4 程度であった（図 21a）。

これらの結果は、卵母細胞の核内においても、5' キャップ構造は単に mRNA 前駆体を安定化するという役割だけでなくスプライシング反応において積極的な役割を果たしていることを強く示唆している。このことを更に確認するために次のような competition 実験を行った。SP6 RNA ポリメラーゼを用いた in vitro 転写系を用いてプラスミド pSP64 (Melton ら, 1984) のマルチクロニング配列を  $\text{m}^7\text{GpppG}$  あるいは  $\text{AppppG}$  存在下で転写することにより、異なる末端構造を持つ二種類の RNA competitor (57 ヌクレオチド長) を調製した（材料と方法を参照）。 $\text{m}^7\text{G}-\delta\text{EX}14-15$  mRNA 前駆体と共に、これら二種類の competitor ( $\text{m}^7\text{G}$ -competitor および A-competitor と呼ぶ) をモル比で mRNA 前駆体の 70 倍量卵母細胞核に注入すると、 $\text{m}^7\text{G}$ -competitor の場合はスプライシング反応を 1/4 程度にまで阻害したのに対して、A-competit



orの場合は全く阻害しなかった（図22レーン1-6）。しかし、この結果だけではcompetitorに存在するキャップ構造がmRNA前駆体に存在するキャップ構造と競合しているのであると明確に断言することはできない。すなわち、スプライシング因子であることが分かっているsnRNAの内、U6RNA以外のsnRNAの5'末端にはメチル基を三つ持った $m^2, 2', 7G$ をblocking nucleosideとして持つ特徴的なキャップ構造が存在する。competitorのキャップ構造はこのsnRNAのキャップ構造と競合することによってスプライシング効率を一般的に低下させている可能性は否定できない。もしこれが正しいのなら $m^7G$ -competitorはA-mRNA前駆体のスプライシング反応も阻害するはずである。しかし、図22に示すように（レーン7-12）、 $m^7G$ -competitorは、A-competitorと同様、A- $\delta$ EX14-15 mRNA前駆体のスプライシング反応を全く阻害しなかった。このことはcompetitorのキャップ構造がmRNA前駆体のキャップ構造と競合してスプライシングを阻害していることを示しており、卵母細胞核内においてもmRNA前駆体のキャップ構造がスプライシング反応において積極的な役割を果たしていることが明確になった。

また、図22をみて気が付くことは、 $m^7G$ -competitorはかなり分解されているように見える（Cで示したバンドが時間と共に下方に移っている）のに対して、A-competitorのバンドはほとんど変化していない。このことから卵母細胞核内において、A-RNAは $m^7G$ -RNAと同等かあるいはそれ以上に安定であることが裏付けられる。このA-RNAの極端な安定性は、アデニンをblocking nucleosideとして持つ様なRNAは生体内には元々存在しないので、その代謝系も存在しないことによるのかも知れない。なお、A-RNAが $m^7G$ -RNAの同等以上に安定であることはHeLa細胞核抽出液中においても当てはまる（データは示さず）。

in vitroスプライシング系においては、 $m^7G$ - $\delta$ EX14-15 mRNA前駆体のスプライシング反応系にモル比で70倍の $m^7G$ -RNAを加えてもスプライシングはまったく阻害されなかった（データは示さず）。また、このことと関連して、in vitro系においては核抽出液を $m^7GTP$ や $m^7GpppG$ 等のキャップ構造類似体で前処理するとスプライシングが阻害されるのに対して、卵母細胞核内においてはキャップ構造類似体をmRNA前駆体の注入30分前にあらかじめ

注入しておいてもスプライシングが阻害されなかったことも指摘しておかねばならない（データは示さず）。in vitro系と微量注入法の系におけるこれらの違いの理由は明かではない。

### c) アフリカツメガエル卵母細胞核内における二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライシングに対するキャップ構造の効果

第一節で述べたように、in vitroスプライシング系においてはキャップ構造は 5' 上流のイントロンのスプライシングだけを促進するという結果が得られた。この結果は、卵母細胞核内においても当てはまるかどうかを調べることにした。in vitroの実験で用いた m<sup>7</sup>G- $\delta$  EX 13-14-15 mRNA 前駆体を卵母細胞核内に微量注入したところ、下流側のイントロン（エキソン 14 と 15 の間のイントロン）のスプライシングはかなりの効率で起こるのに対して上流側のイントロン（エキソン 13 と 14 の間のイントロン）のスプライシングは全く起こらないことが分かった。また、この上流側のイントロンだけを持つ m<sup>7</sup>G- $\delta$  EX 13-14 mRNA 前駆体も卵母細胞核内では全くスプライシングを受けないことが明らかになった（データは示さず）。このことの原因は明かではないが、ニワトリとアフリカツメガエルではスプライス部位の共通配列が若干異なっており、このイントロンのスプライス部位配列がたまたまアフリカツメガエルの共通配列から大きくはずれているのかも知れない。

そこで、卵母細胞核内で効率よくスプライシングを受けることが分かっているエキソン 14 と 15 の間のイントロンを同一分子内に二つ持つような人工の mRNA 前駆体を作成することにした（材料と方法を参照）。その際にどちらのイントロンが除去されたかがゲルパターンからすぐ分かるように、一方のイントロンにだけ中央部に欠失を導入することにした（図 20）。この  $\delta$  EX 14-15  $\Delta$ N / 14-15 mRNA 前駆体の中央のエキソンはエキソン 15 と 14 のキメラとなっているが、すべてのスプライス部位配列やブランチ部位配列は元のままである。この  $\delta$  EX 14-15  $\Delta$ N / 14-15 mRNA 前駆体のスプライシングにおけるキャップ構造の効果を、in vitroスプライシング系（図 23 a）および微量注入法の系（図 23 b）において調べた。

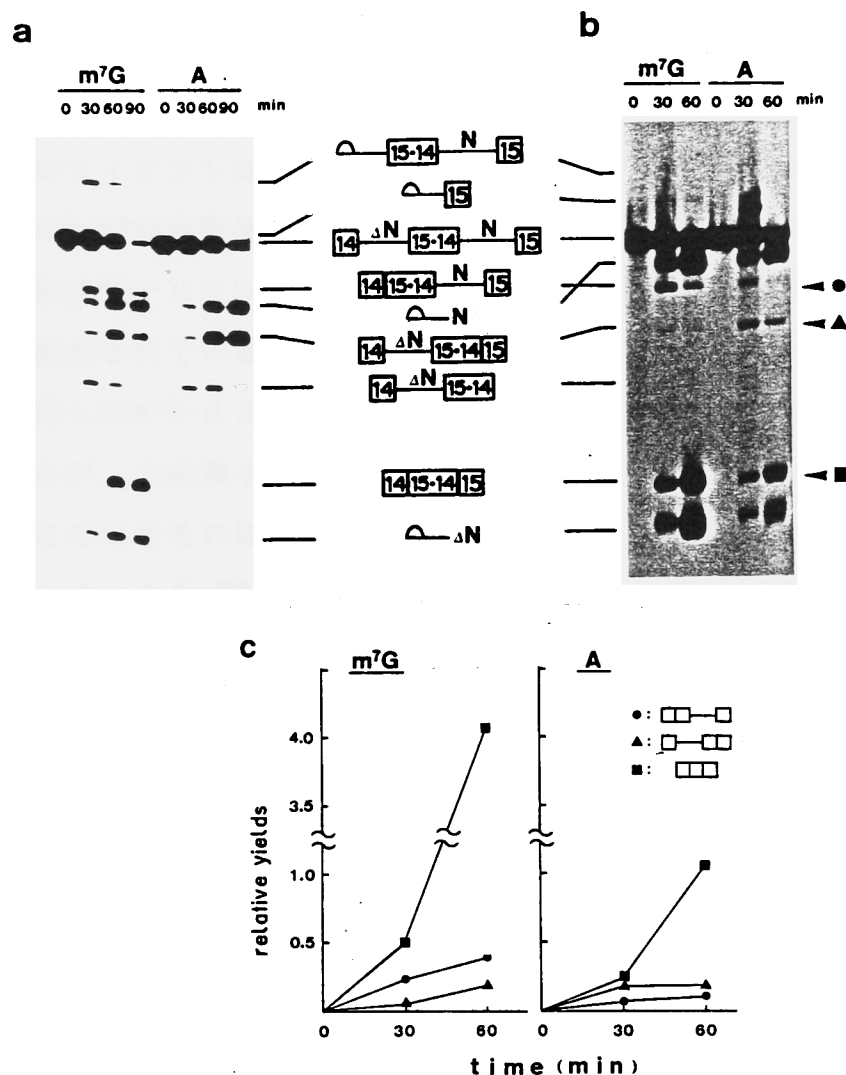


図 23. 異なる 5' 末端構造を持つ  $\delta$  EX 14-15  $\Delta$ N / 14-15 mRNA 前駆体のスプライシング反応のキネティクス.

m<sup>7</sup>G-mRNA 前駆体あるいは A-mRNA 前駆体のスプライシング反応を、*in vitro* 系 (a)、あるいは微量注入の系 (b) において解析した。RNA 産物は、8M 尿素を含む 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画した。(b) における三種類のバンドをゲルから切り出し、その放射活性 (Cerenkov 光) を測定し、各時点で残存する mRNA 前駆体に対するモル比を計算し、プロットした (c)。黒丸: 上流側イントロン ( $\Delta$ N) だけが除去された分子。黒三角: 下流側イントロン (N) だけが除去された分子。黒四角: 最終産物。

図23のaに示すように、 $m^7G-\delta EX 14-15 \Delta N / 14-15$  mRNA前駆体をHeLa細胞核抽出液で処理すると、正確に効率よくスプライシング反応が起こり、三つのエキソンが連結された最終産物が効率よく産生された。どちらか一方だけのイントロンが除去されたような二種類の間体に注目し、上流側イントロン（イントロン $\Delta N$ ）だけが除去された間体をRNA A、下流側イントロン（イントロンN）だけが除去された間体をRNA Bと呼ぶことにする。 $m^7G$ -mRNA前駆体の場合は、RNA Aが30分でかなりの量が産生され60分以後は減少していく。三つのエキソンの連結された最終産物は60分で急激に産生されている。RNA BはRNA Aよりやや遅れて出現する。この結果は、前述した $m^7G-\delta EX 13-14-15$ の*in vitro*の結果と基本的には同じであるが、上流側イントロンの方が下流側より効率よく除去されるという現象はこの場合それほど明確ではない。これに対して、 $A-\delta EX 14-15 \Delta N / 14-15$  mRNA前駆体の場合は、RNA Bの産生はかなりの効率で起こるにもかかわらず、RNA Aと最終産物の産生は極端に阻害される。このA-mRNA前駆体でみられた現象は、5'三リン酸の末端を持つuncapped  $\delta EX 13-14-15$  mRNA前駆体のスプライシングと全く同様である（図14参照）。このように、A-mRNA前駆体はHeLa細胞核抽出液中で極端に安定であるにもかかわらず*in vitro*スプライシング系においてはキャップ構造を持たないmRNA前駆体として振舞う。

異なる末端構造を持つ $\delta EX 14-15 \Delta N / 14-15$  mRNA前駆体を卵母細胞核に微量注入法した結果を図23のbに示した。また、この図のRNA A、RNA B及び最終産物に相当するバンドをゲルから切り出してその放射活性を測定し、各時間における残存mRNA前駆体に対するモル比を計算しプロットしたものが図23のcである。 $m^7G$ -mRNA前駆体を注入したときは、RNA Aと最終産物はかなり効率よく産生されているのに対してRNA Bの産生はほとんど検出できない。しかし、A-mRNA前駆体の場合には、RNA Bの産生はやや増加するのに対してRNA Aと最終産物の産生は阻害された。最終産物の産生量は $m^7G$ -mRNA前駆体の場合と比べて約1/4に低下している。この結果は、最終産物の産生の阻害が*in vitro*程劇的ではないけれども、概ね*in vitro*の結果と一致している。

m<sup>7</sup>G-mRNA前駆体の場合は、上流側イントロンのスプライシングの方が下流側よりも、キャップ構造の効果によって効率よく起こっているように見える。この現象が二つのイントロンの固有のスプライシング効率の違いを反映するものではないということを、 $\delta EX 13-14-15$  mRNA前駆体の場合と同様に次のようにして確認した。各イントロンを単独に持つ $\delta EX 14-15 \Delta N$  mRNA前駆体と $\delta EX 14-15$  mRNA前駆体を卵母細胞核に注入して各イントロンのスプライシング効率を比較してみると、 $\delta EX 14-15$  のイントロン（下流側イントロン）の効率の方が1.2-1.8倍程良いことが分かった（データは示さず）。更に、この二つのイントロンの位置を前後逆に持つmRNA前駆体である $\delta EX 14-15 / 14-15 \Delta N$ を卵母細胞核に微量注入法したところ、キャップ構造を持つ場合には上流側イントロン（ $\delta EX 14-15$  のイントロン）の方が下流側イントロン（ $\delta EX 14-15 \Delta N$  のイントロン）よりも効率よく除去されることが分かった。すなわち、卵母細胞核内においても、in vitro系と同様にキャップ構造は位置的にキャップ構造に近傍の上流側イントロンのスプライシングを促進すると考えられる。

卵母細胞核への微量注入法によって得られた以上の結果から、卵母細胞核内においてもHeLa細胞核抽出液を用いたin vitroスプライシング系と同様に、キャップ構造が単にmRNA前駆体を安定化するだけでなくスプライシング反応に積極的な役割を果たしていると言える。

### 第3節. 核内キャップ構造結合蛋白

#### a) HeLa細胞の核内キャップ構造結合因子の同定

第1節及び第2節において述べた実験結果は、スプライシング反応におけるキャップ構造の効果が核内に存在しキャップ構造を特異的に認識するような因子に担われていることを強く示唆するものである。その因子の性質を明らかにすることは、スプライシングの機構を理解する上での大きな手がかりになるかも知れないと考えて、そのような因子をHeLa細胞核抽出液中に同定することを試みた。

筆者は、キャップ構造結合活性を検出するために、キャップ構造を持つRNAをプローブとするゲル移動度シフト法を開発した。この方法の原理は、もしキャップ構造結合因子がプローブRNAのキャップ構造に結合すると、その複合体の非変性ゲル電気泳動における移動度がfreeのプローブよりも遅くなるであろうということに基づいている。もちろん、ある因子がプローブのキャップ構造ではなくRNA鎖の部分に結合してもバンドのシフトは起こる。しかし、そのようにしてシフトしたバンドは、結合反応系に $m^7GpppG$ や $m^7GTP$ 等のキャップ構造類似体をcompetitorとして添加した場合や、プローブとしてキャップ構造を持たないRNAを用いた場合にも出現するはずであるから、キャップ構造そのものに結合している因子とは区別できる。使用したプローブは、卵母細胞核への微量注入実験におけるcompetitorとして用いたものと同じRNA、すなわちpSP64ベクターのマルチクロニング配列をSP6 RNAポリメラーゼで転写したRNA（57ヌクレオチド長）を用いた。このRNAは、当然イントロン配列を持ってはいない。キャップ構造を持つプローブとしては $m^7GpppG$ をプライマーとして合成したRNA（ $m^7G$ -probeと呼ぶ）を、キャップ構造を持たないプローブとしてはプライマーを用いないで合成した5'三リン酸を持つRNA（ppp-probeと呼ぶ）を使用することにした。

HeLa細胞核抽出液のKCl濃度を3M KClを用いて1M KClに調節し、Cellulofine GCL-2000カラムを使ってゲル濾過クロマトグラフィーを行った。各フラクションのキャップ構造結合活性をゲル移動度シフト法で検定した。図24に示すように、分子量44万ダルトンから4万ダルトンの範囲にわたって少

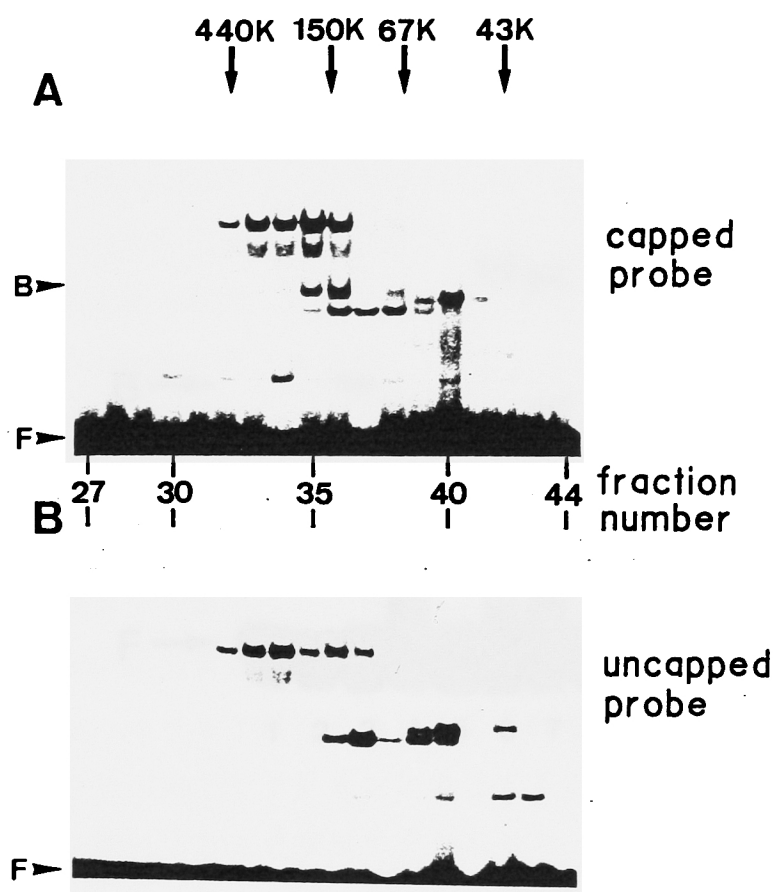


図 2 4. キャップ構造結合因子の同定。

HeLa細胞核抽出液 (0.6 ml) を 3M KCl を用いて 1M KCl-バッファー B (材料と方法参照) に調整し、同じバッファーで平衡化した Cellulofine GCL-2000 ゲル濾過カラム (1.5 x 36 cm) で分画し、1 ml ずつフラクションを集めた。キャップ構造を持つプローブ (パネル A) 及びキャップ構造を持たないプローブ (パネル B) を用いて、ゲル移動度シフト法で、各フラクションの 0.5  $\mu$ l 分のキャップ構造結合活性を検定した。free のプローブのバンドと、キャップ構造結合因子によってシフトしたバンドを、それぞれ F と B で示した。同じカラムで分画された蛋白分子量マーカーの位置を図の上に示した。

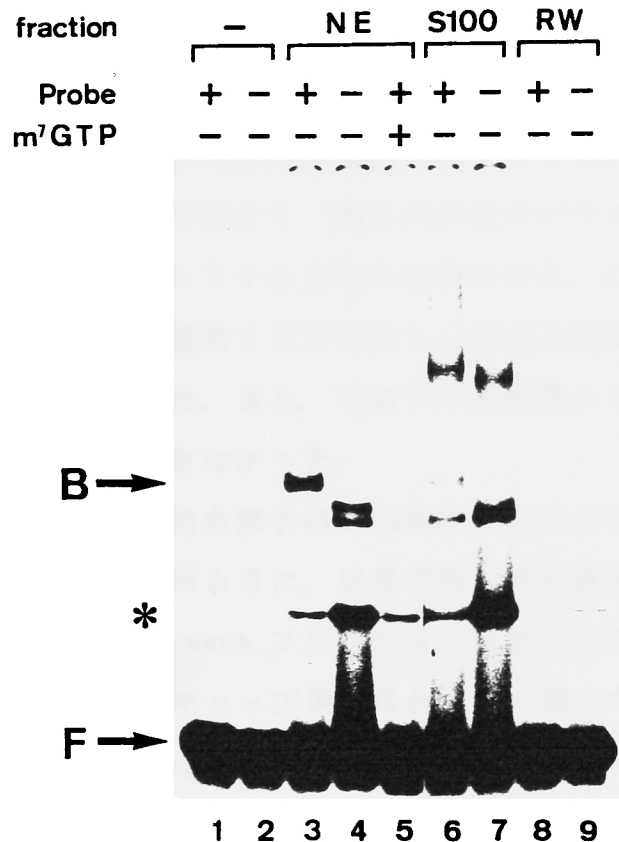


図 2 5. キャップ構造結合因子の局在性.

HeLa細胞から、核抽出液 (NE; レーン 3 - 5)、細胞質S100フラクション (S100; レーン 6 と 7)、およびリボソーム high salt washフラクション (RW; レーン 8 と 9) を調製した (材料と方法を参照)。HeLa細胞約 20 万個分に相当する各フラクションのキャップ構造結合活性を、キャップ構造を持つプローブ (レーン 1, 3, 5, 6, 8) 及びキャップ構造を持たないプローブ (レーン 2, 4, 7, 9) を用いて、ゲル移動度シフト法で検定した。レーン 5 では、核抽出液をあらかじめ、150  $\mu$ M の m<sup>7</sup>GTP と 20 °C・10 分間 pre-incubate したものをを用いた。レーン 1 と 2 では、フラクションを加えなかった。F 及び B は、図 2 4 と同様である。\* で示したバンドは、free のプローブの二次構造の異なるもののバンドである。



なくとも数本のシフトしたバンドが両方のプローブでみられた。ほとんどのバンドは $m^7G$ -probe と ppp-probe の両方でみられるが、Bで示したバンドだけは $m^7G$ -probe においてのみ出現した（パネルA）。このバンドBをゲルから切り出して除蛋白処理後、再び同様のゲル電気泳動を行うと、freeのプローブの位置にバンドがみられた（データは示さず）。このことから、このバンドBはプローブRNA が共有結合的な構造変換（例えばRNA ligation）することによって出現したものではなく、何らかの因子がキャップ構造に結合したためプローブのバンドがシフトしたものだと思われる。このバンドBに相当する因子はカラムから分子量約10万ダルトン付近に溶出され、比較的高分子量であることが示唆された。また、このゲル移動度シフト法では他のキャップ構造結合因子は同定できなかった。

次に、このキャップ構造結合因子のHeLa細胞内の局在性を調べた。HeLa細胞を（材料と方法）で述べたように、核抽出液、細胞質S100フラクション、及びリボソーム high salt wash フラクション（RWフラクション）の三分画し、各フラクションのキャップ構造結合活性を調べた。図25は、HeLa細胞約20万個分に相当する各フラクションを用いてゲル移動度シフト法を行ったものである。キャップ構造結合活性の8割程度が核抽出液（NE）中に、また約2割が細胞質S100フラクションに存在することが分かった。RWフラクションにはこの活性はほとんど検出できなかった。この結果から、この因子（少なくとも活性のある因子）は、その大部分が核内に存在することが分かった。この因子の $m^7G$ -probe への結合はキャップ構造類似体によって阻害されることから（図25、レーン5）この因子がキャップ構造に結合していることがさらに確認された。これ以後、この因子をCAPRECON（CAP RECOGNITION FACTOR IN NUCLEI）と呼ぶことにする。

#### b) 核内キャップ構造結合因子の性質

次にHeLa細胞核抽出液を用いてCAPRECONのキャップ構造結合活性の性質を調べてみた。この結合活性はMicrococcus のヌクレアーゼに耐性であるが、蛋白分解酵素であるプロテイナーゼK処理で失活する（図26Aのレーン2と3）ことから、CAPRECONは蛋白因子であることが明らかになった。また、

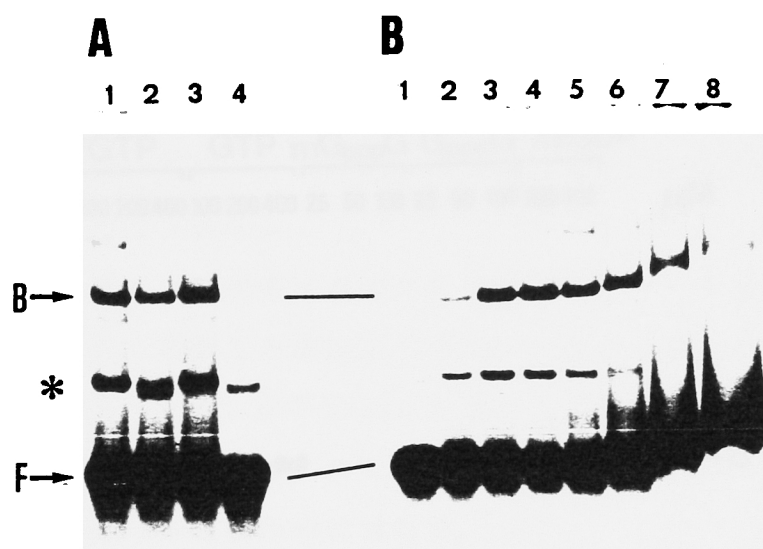


図 2 6. キャップ構造結合活性の性質.

F, B 及び \* で示すバンドは、図 2 5 と同様である。(A) HeLa細胞核抽出液を、1 mM  $\text{CaCl}_2$  及び 70 U/ml Micrococcus ヌクレアーゼの存在下で  $30^\circ\text{C}$ ・30 分間インキュベートした後、3 mM EGTA で反応を停止させた(レーン 3)。レーン 2 の場合は、最初から 3 mM EGTA を加えて、同様のインキュベーションを行った。レーン 1 の場合は、核抽出液を、単に  $30^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。レーン 4 の場合は、核抽出液を、1 mg/ml のプロテイナーゼ K 存在下で、 $30^\circ\text{C}$ ・30 分間インキュベートした。それぞれの処理をした核抽出液の 0.3  $\mu\text{l}$  分のキャップ構造結合活性を、キャップ構造を持つプローブを用いたゲル移動度シフト法で検定した。(B) 核抽出液 0.3  $\mu\text{l}$  分のキャップ構造結合活性を、様々な濃度の KCl 存在下で検定した。レーン 1 はプローブのみを泳動した。レーン 2: 0 mM KCl, 3: 25 mM, 4: 50 mM, 5: 100 mM, 6: 200 mM, 7: 500 mM, 8: 1000 mM.

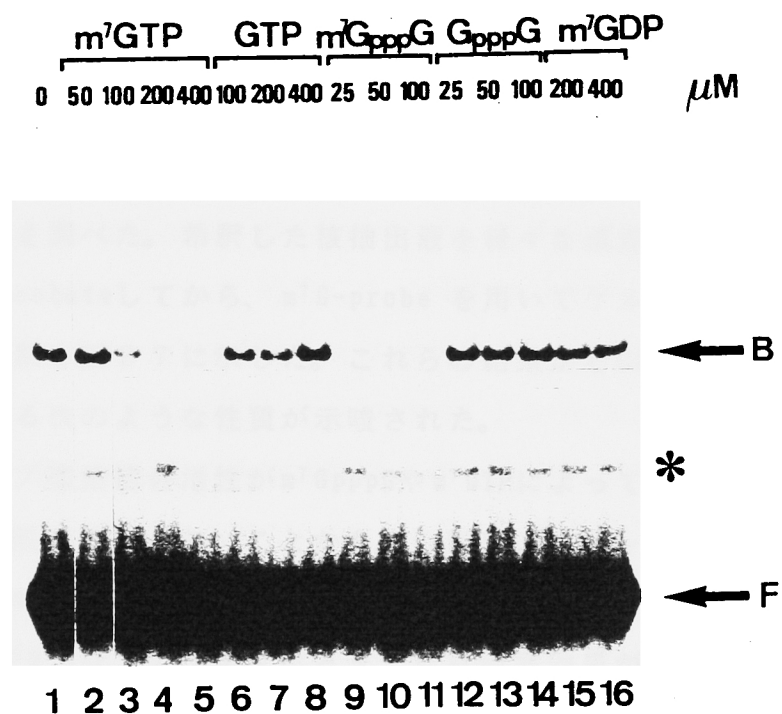


図 2 7. キャップ構造結合活性に対するキャップ構造類似体の影響.

30 倍に希釈した核抽出液を、レーン上に示すような様々な濃度のキャップ構造類似体と 20 °C で 10 分間 pre-incubate してから、キャップ構造を持つプローブでゲルシフトを行った。F、B 及び \* で示すバンドは、図 2 5 と同様である。

この活性はATP や $Mg^{2+}$ 、あるいは5 mMまでのEDTAを添加しても全く影響を受けないことが分かった（データは示さず）。また、この結合活性に対するKCl 濃度の影響を調べたところ（図26B）、25mM-500mMの広い範囲の濃度で高い活性を持つことが分かった。1M KClの存在下でさえかなりの結合が起こっていることが分かる。また、KCl 50mMの条件で一旦形成された複合体が、どこまで高塩濃度のKCl に耐えられるかを同様に調べたところ、700mM KCl 存在下でもこの複合体の大部分は解離しないことが分かった。この複合体を解離させるためには4M以上の尿素が必要であった（データは示さず）。この極端な塩濃度耐性の性質は、アフィニティーカラムを用いたCAPRECONの精製に大きな武器となった（後述）。

次にCAPRECONのキャップ構造結合活性に対する様々のキャップ構造類似体の阻害効果を調べた。希釈した核抽出液を様々な濃度の各キャップ構造類似体とpre-incubateしてから、 $m^7$ G-probe を用いてゲル移動度シフト法を行った。その結果を図27に示した。これらの結果からCAPRECONのキャップ構造結合に関する次のような性質が示唆された。

1) キャップ構造結合活性が $m^7$ GpppGや $m^7$ GTPによって阻害されているがGpppGやGTPには阻害効果がないことから、CAPRECONのキャップ構造への結合にはblocking guanosineの7位のメチル基が重要である。

2)  $m^7$ GDPや $m^7$ GMP（データは示さず）には阻害効果がないことから、三リン酸基の存在が結合に重要であると考えられる。

3)  $m^7$ GpppGの方が $m^7$ GTPよりも阻害効果がかなり高いことから考えて、CAPRECONのキャップ構造の認識には、5'-ppp-5'のblocking構造が部分的に重要である可能性がある。この可能性は、後に示す精製したCAPRECONを用いたゲルシフト実験からも示唆された。

in vitroスプライシング反応がGpppGによって弱く阻害される理由はおそらくGpppGが核抽出液中でメチル化されるからであろうということを以前に述べた。このことから考えると、核抽出液のキャップ構造結合活性が高濃度のGpppGによっても阻害されないことは不思議に思われるかも知れない。しかし、in vitroスプライシング反応系とは異なり、このゲル移動度シフト法の反応系においては、核抽出液が30倍に希釈されているために十分なメチ

ル化が起こり得ないからであると考えられる。

### c) 核内キャップ構造結合蛋白 (CAPRECON) の精製

CAPRECONの実体を明らかにするために、HeLa細胞核抽出液からCAPRECONの精製を試みた。精製はゲル移動度シフト法を活性の検定法にして、(材料と方法)に述べた手順で行った。簡潔に言えば、 $2 \times 10^{10}$ のHeLa細胞から調製した核抽出液をDEAE-celluloseカラムにloadし、150mM KClのバッファーでよく洗った後、300mM KClで溶出する(DE-300フラクション)。これを次にBio-Gel A 1.5mゲル濾過カラムを用いて分画する。活性のあるフラクションを集め(Bio-Aフラクション)、DEAE-Toyopearlカラムで濃縮した(DE-Toyoフラクション)。このフラクションをcapped RNA-Sepharoseカラムにapplyし、カラム容積の20倍の700mM KClを含むバッファーでよく洗った後、4M尿素を含むバッファーで溶出した(精製CAPRECONフラクション)。

capped RNA-Sepharoseは、ゲル移動度シフト法に用いた $m^7$ G-probeを大量に合成し、それを臭化シアンで活性化したSepharoseに結合させることにより調製した(材料と方法を参照)。各精製段階のフラクションの蛋白量及び比活性等は表1に示した。活性は、20 ngの $m^7$ G-probeを用いた標準の反応系で1 ngのプローブをシフトさせる活性を1ユニットと定義した。最後の4M尿素による溶出でかなりの失活がみられたにもかかわらず、核抽出液から比活性を約1000倍にまで上昇させることができた(表1)。このようにして精製したCAPRECONフラクションはほぼ完全にhomogeneityとなっており、SDSゲル電気泳動後銀染色すると約8万ダルトンの位置に単一のバンドがみられた(図28A)。三種類の異なる末端構造を持つプローブを用いて、精製したCAPRECONの結合を調べた結果が図28のBである。CAPRECONは $m^7$ G-probeに効率よく結合しその結合はキャップ構造類似体により阻害される(レーン1-3)。しかし、GpppGをプライマーとして合成されたG-probeにも非常に弱く結合することから(レーン4, 5)、キャップ構造類似体による阻害実験からも示唆されていたように、CAPRECONは5'-ppp-5'のblocking構造も部分的に認識するのかも知れない。しかし、G-probeを合成する過程で、SP6 RNAポリメラーゼ標品中に混在していたメチル化酵素によってG-probeの一部がそ

表 1. CAPRECONの精製.

	総蛋白量 (mg)	総活性 (ユニット)	比活性 (ユニット/mg)	回収率 (%)
HeLa細胞核抽出液	568	156000*	275	100
DEAE-cellulose	130	112000	862	71
Bio-Gel A	11.2	32400	2890	20
DEAE-Toyopearl	7.0	33400	4770	21
Capped RNA-Sepharose	0.02	5400	270000	3.4

\* 20 ng の $m^7G$ -probe を用いる標準のゲル移動度シフト法の反応系で、  
1 ng の $m^7G$ -probe をシフトさせる活性を1ユニットと定義した。

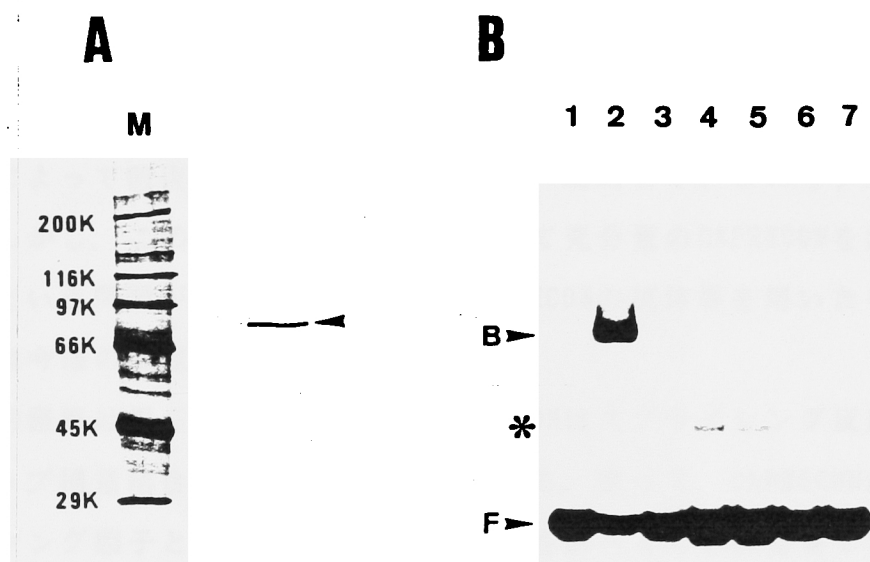


図 2 8. 精製したCAPRECONの純度とキャップ構造結合活性の特異性

(A) 精製したCAPRECON (70 ng) を、12.5% SDS ゲル電気泳動 (Laemmli, 1970) によって分画し、銀染色した。同時に泳動した蛋白分子量マーカーの位置を左側に示した。(B) 精製したCAPRECON (70 ng) を用いたゲル移動度シフト。F, B 及び\*で示すバンドは、図 2 5 と同様である。プローブは、 $m^7GpppG$  をプライマーにしたもの (レーン 1 - 3)、 $GpppG$  をプライマーにしたもの (レーン 4 と 5)、及び  $ApppG$  をプライマーにしたもの (レーン 6 と 7) の三種類を用いた。レーン 2, 3, 5, 7 では、精製したCAPRECON (70 ng) を用いた。レーン 3 では、精製したCAPRECONを、150  $\mu M$  の  $m^7GTP$  と 20  $^{\circ}C$  で 10 分間 pre-incubate してから用いた。レーン 1, 4, 6 では、プローブだけを泳動した。

のguanosine の7位にメチル化を受けることにより $m^7G$ -probe に変換されたという可能性は排除できない。また、CAPRECONとA-probe やppp-probe との結合は検出できなかった(レーン6, 7、データは示さず)。

#### d) 核内キャップ構造結合蛋白のスプライシング因子との会合

CAPRECONが*in vitro*スプライシング反応に関与することの証拠は今のところ得られていない。すなわち、精製したCAPRECONを $m^7G$ - $\delta$  EX 14-15 mRNA前駆体の*in vitro*スプライシング系に添加したが、スプライシング反応は促進されなかった。また、 $m^7G$ - $\delta$  EX 14-15 mRNA前駆体のスプライシング反応を20  $\mu$ Mの $m^7G$ pppG によって阻害しておき、その阻害効果をCAPRECONの添加によって回復させようとする試みは、成功していない(データは示さず)。しかし、このような実験には、果して充分量のCAPRECONを添加したかどうかという問題が常に付きまとう。CAPRECONの抗体等を用いたもっと確実な実験は今後の課題である。

実験的証拠は得られていないが、CAPRECONはスプライシング反応に関与するキャップ構造結合因子の有力な候補である。従って、CAPRECONが既知のスプライシング因子と会合しているかどうかを調べることは重要であると考えて、次のような免疫沈降実験を行った。自己免疫病の患者の血清の中にはスプライシング因子であるsnRNP に対する抗体を持つもののがかなり存在する。そのような抗体とプロテインAセファロースを用いてCAPRECONの活性が特定のsnRNP と共に免疫沈降するかどうかを調べることにした。使用した血清と免疫沈降法の詳細は(材料と方法)で述べたが、それらの血清に含まれる抗体は以下の通りである。1) anti-U1, 2) anti-U1とanti-Smの混合物, 3) anti-Sm, 4) anti-U2, 5) 正常ヒト血清, 6) anti-Sm 単クローン抗体(Y-12)。Smというのは、序論で述べたようにメジャーなsnRNP に共通に存在する抗原である。これらの血清をまず、それぞれプロテインAセファロースと混合し、室温で2時間攪拌することにより、血清に含まれる抗体をプロテインAセファロースに結合させた。次に、各抗体の結合したプロテインAセファロースをHeLa細胞核抽出液と混合し、インキュベートすることにより、標的のsnRNP を抗体-プロテインAセファロースに結合させた。そして遠心



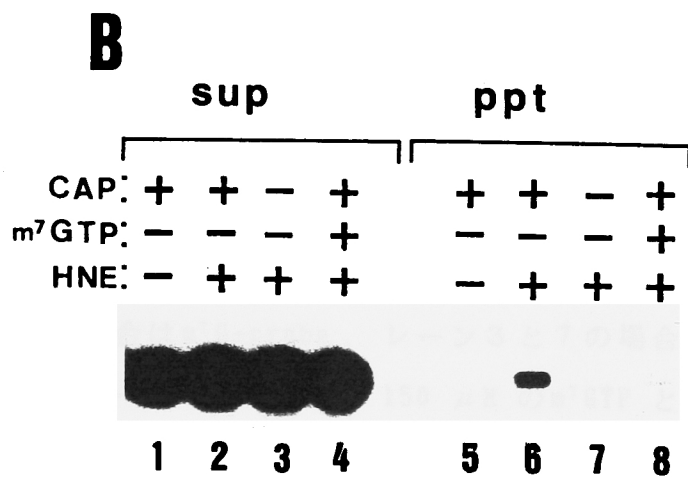
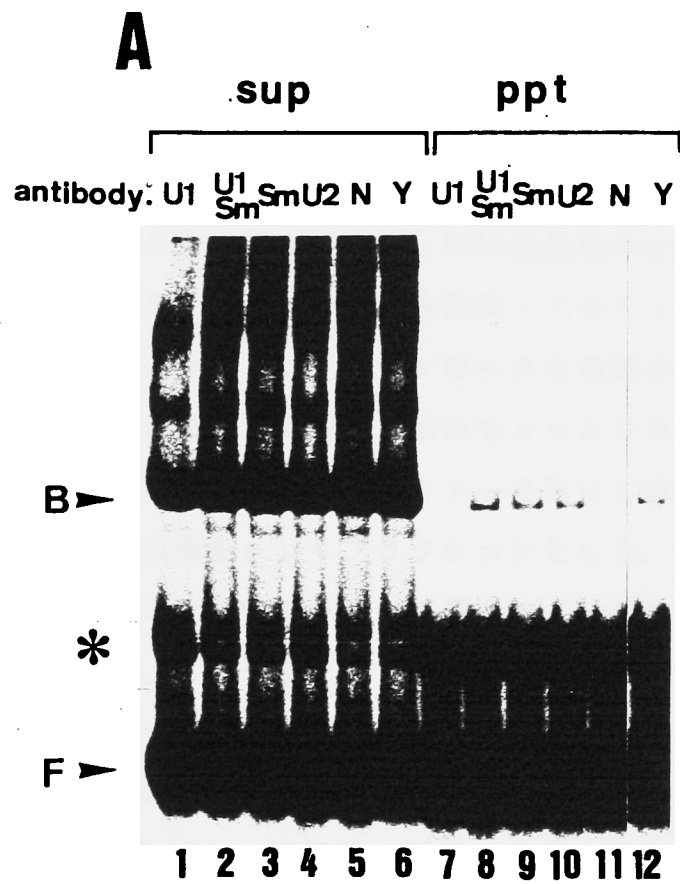


図 2 9. キャップ構造結合活性の免疫沈降（次頁に続く）。

図 2 9. キャップ構造結合活性の免疫沈降（続）。

（A）各レーンの上に示したような snRNP に対する抗体を含む血清を、プロテイン A セファロースと混合し、室温で 2 時間攪拌することにより、血清に含まれる抗体をプロテイン A セファロースに結合させた。次に、各抗体が結合したプロテイン A セファロースを、HeLa 細胞核抽出液と混合しインキュベートすることにより、標的の snRNP を抗体-プロテイン A セファロースに結合させた。そして遠心によってセファロースを沈澱させることにより、標的の snRNP を沈澱させた。この時の上澄みを s u p フラクションとした。沈澱はよく洗った後、1M KCl を含むバッファーを用いて沈澱と会合している因子を溶出し、その溶出液を p p t フラクションとした。この s u p フラクションと p p t フラクション中のキャップ構造結合活性を、ゲル移動度シフト法によって検定した。F、B 及び \* で示すバンドは、図 2 5 と同様である。レーン 1 と 7：anti-U1，2 と 8：anti-U1 と anti-Sm の混合物，3 と 9：anti-Sm，4 と 10：anti-U2，5 と 11：正常ヒト血清，6 と 12：anti-Sm 単クローン抗体（Y-12）。詳細は、材料と方法を参照されたい。（B）HeLa 細胞核抽出液を、anti-U2 抗体を結合させたプロテイン A セファロースと混合する際に、ゲル移動度シフト法に使用している RNA プローブ（約 40 ng）を同時に加え、以下は（A）と同様の操作により s u p フラクションと p p t フラクションを調製した。各フラクションをプロテイナーゼ K 処理及びフェノール処理をすることにより除蛋白し、エタノール沈澱により RNA を回収した。回収した RNA を 8M 尿素を含む 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し、オートラジオグラムをとった。プローブは、レーン 1，2，4，5，6，8 の場合は  $m^7$ G-probe、レーン 3 と 7 の場合は ppp-probe (uncapped) を用いた。レーン 4 と 8 では、150  $\mu$ M の  $m^7$ GTP と pre-incubate した核抽出液を用いた。レーン 1 と 5 では、核抽出液の代わりに、核抽出液と同じバッファーを用いた。

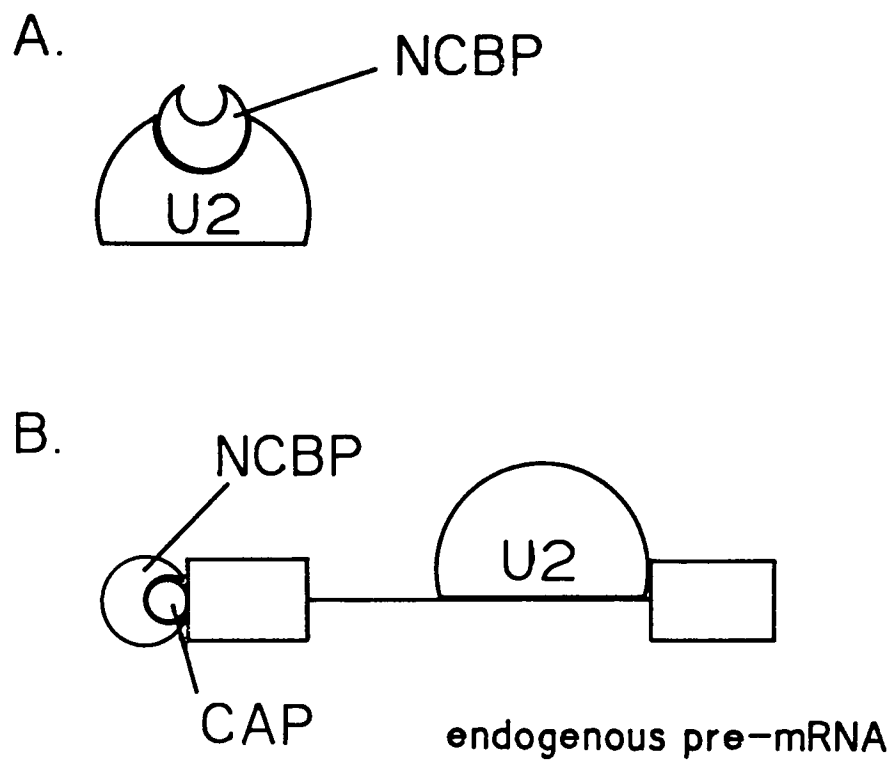


図 3 O. CAPRECON と U2 snRNP の会合に関する二つのモデル。

( A ) CAPRECON ( NCBP ) が、直接 U2 と結合しているモデル。 ( B ) CAPRECON ( NCBP ) が、 endogenous な mRNA 前駆体を介して、 U2 と会合するモデル。

によってセファロースを沈澱させることにより、標的のsnRNPを沈澱させた。この時の上澄みをsupフラクションとした。沈澱はよく洗った後、1M KClを含むバッファーを用いて沈澱と会合している因子を溶出し、その溶出液をpptフラクションとした。このsupフラクションとpptフラクション中のキャップ構造結合活性を、ゲル移動度シフト法によって検定した。

図29Aに示すように、2) U1&Sm、3) Sm、4) U2、6) Sm-monoclonalの抗体でキャップ構造結合活性の約1割程度が沈降するが、1) U1や5) 正常血清では全く沈降しないことが分かった。別のanti-U1血清(anti-U1 Ag、材料と方法を参照)を用いてもやはりキャップ構造結合活性は沈降しなかった(データは示さず)。CAPRECONを沈降させることのできる抗体の共通項はU2 snRNPであるので、CAPRECONは部分的に少なくともU2と会合していることが示唆された。もちろんU2と抗原性を同じくする他のマイナーなsnRNPである可能性はある。また、沈澱に存在するキャップ構造結合活性の大半は、沈澱から300 mM程度のNaClで溶出されてくることから(データは示さず)、CAPRECONとU2の会合はかなり弱いものと考えられる。

各抗体は核抽出液中のすべての標的を沈降できるだけの抗体価を持っているので、約1割の活性しか沈降しないのは抗体価が低いためではない。核抽出液に対する血清の割合を増やしても、沈降する活性の割合は増加しなかった(データは示さず)。また、インキュベーションによってこの割合が増加するかも知れないと考えて、核抽出液をin vitroスプライシングの条件でインキュベートしたが沈降する割合は変化しなかった。また、HeLa細胞核抽出液の代わりにHeLa細胞をそのまま超音波破碎したライセートを用いてもやはり同様の結果が得られたことから(データは示さず)、この現象は核抽出液を調製する際のartefactではないと考えられる。CAPRECONそのものがU2抗原あるいはSm抗原である可能性は次のような理由で否定される。

1) U2抗体あるいはSm抗体を用いたWestern Blotting法において、CAPRECONのバンドは検出されない(データは示さず)。

2) 抗体価が充分であるにもかかわらず、約1割のCAPRECONしか沈降しない。

3) CAPRECONとU2の会合は、300 mM程度の塩で解離する程度の弱い結合であり、抗原-抗体の結合とは思われない。

この免疫沈降実験の結果は、図30のAのようにCAPRECONとU2が必ずしも直接会合していることを証明するものではない。すなわち、U2はmRNA前駆体のブランチ部位に強く結合することが分かっているので、図30のBのように核抽出液中のendogenousなmRNA前駆体を介してCAPRECONと会合している可能性が考えられる。AとBのどちらのモデルが正しいかを検定するために次のような実験を行った。ゲル移動度シフト法の $m^7G$ -probeをHeLa細胞核抽出液と混合した後、U2抗体を結合したプロテインAセファロースを用いて免疫沈降を行い、 $m^7G$ -probeがU2抗体で沈降するかどうかを調べた。このプローブはプラスミドpSP64のマルチクローニング配列に由来するものであり、ブランチ部位配列を持っていないので、U2 snRNPはプローブそのものには結合しないはずである。もしAのモデルが正しいのなら、 $m^7G$ -probeはCAPRECONに結合することによってU2と共に沈降するが、Bが正しい場合はCAPRECONのキャップ構造結合部位がすでに使用されているので $m^7G$ -probeは沈降しないはずである。結果は図29のBに示すように、 $m^7G$ -probeがU2抗体で沈降することが分かった(レーン6)。キャップ構造類似体が核抽出液中に存在する場合や、プローブとしてppp-probeを用いた場合にはプローブの沈降が阻害されることから(図29Bのレーン7, 8)、U2 snRNPが $m^7G$ -probeに直接結合している可能性は否定される。従って、CAPRECONの一部はU2 snRNPと直接会合していると思われる。直接の会合と言っても、CAPRECONがU2 RNAのtrimethylguanosineのキャップ構造に結合している可能性は否定できる。その理由は、一つはモデルBの否定と同様の理由であり、もう一つは同じキャップ構造を持つU1 RNAとCAPRECONが会合していないということである。

CAPRECONがダイマー形成の可能性も含めて複数のキャップ構造結合部位を持つこともあり得る。この様な場合には、図29のBの結果は必ずしもCAPRECONとU2の直接会合を示すものではなくなるということを付け加えておかねばならない。

## 第IV章 考察

### a) スプライシングシグナルとしてのキャップ構造

HeLa細胞核抽出液を用いた *in vitro* スプライシング系においても、アフリカツメガエルの卵母細胞核への mRNA 前駆体の注入実験においても、キャップ構造がスプライシング反応に重要であることを示す結果が得られた。特に、卵母細胞核への注入実験においては、アデノシンを blocking nucleoside として持つ mRNA 前駆体を uncapped RNA として用いるというトリックを用いることによりキャップ構造の効果を mRNA 前駆体の安定性の問題と切り放すことに成功し、キャップ構造が単に mRNA 前駆体を安定化するだけでなくスプライシング反応において積極的な役割を担っていることを明確に示すことができた。すなわち、単一のイントロンを含む mRNA 前駆体においてはキャップ構造はそのスプライシング効率を 3 - 4 倍促進する。また、二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体においては、キャップ構造はその構造に近い方のイントロンのスプライシングを促進することによって、結果的に三つのエキソンが効率よく連結される。このようにスプライシング反応において積極的な役割を果たしているキャップ構造を、両スプライス部位配列やブランチ部位配列に続く第四のスプライシングシグナルと呼んでもさしつかえないのかも知れない。

スプライシングシグナルとしてのキャップ構造には blocking guanosine の 7 位のメチル基が重要であることが明らかになった。しかし、高等動物の mRNA 前駆体のキャップ構造の大部分は blocking guanosine の隣のヌクレオシドのリボースの 2' 位もメチル化されたタイプ 1 のキャップ構造として存在している。このリボースのメチル基がスプライシングに重要であるかどうかは興味あるところであるが、次のような理由でこのメチル基はスプライシングには重要ではないと考えられる。リボースの 2' 位にもメチル基を持つキャップ構造類似体である  $m^7GpppGm$  をプライマーとして合成した mRNA 前駆体は、HeLa細胞核抽出液を用いた *in vitro* スプライシング系においては、 $m^7GpppG$  をプライマーとして合成した mRNA 前駆体と同様の効率でスプライシングされる（データは示さず）。しかし、HeLa細胞核抽出液には既に述べたようにグアノシンの 7 位をメチル化する酵素活性は存在するが、リボースの 2' 位を

メチル化する2'-O-methyltransferaseの活性は検出できない（データは示さず； Sakamotoら，1987）ので、 $m^7G$ -mRNA前駆体が核抽出液中で2'-O-methyl化されてからスプライシングを受けているとは考えられない。

スプライシングを便宜上、スプライスソーム形成、反応の第一段階、及び反応の第二段階の三つに分けるとすると、スプライシングシグナルとしてのキャップ構造はスプライシングのどの段階を促進するのであろうか。スプライスソーム形成にキャップ構造が必要であるという報告があるが（Patzeltら，1987）、筆者はA- $\delta$ EX14-15 mRNA前駆体でも $m^7G$ - $\delta$ EX14-15 mRNA前駆体とほぼ同様の効率でスプライスソームが形成されるという予備的な結果を得ている。両者の違いの理由は明かではないが、筆者は次のように考えている。スプライスソームは動的な構造であり、スプライシング反応が完了するとともに小さな複合体に解離することが知られている（KonarskaとSharp,1987）。従って、スプライスソーム形成の効率を厳密に比較するためには、反応が起こる前のごく初期の時点（10-15分）で比較するか、あるいは、スプライスソーム形成は起こるが反応は起こらない条件でスプライスソーム形成だけを比較する必要がある。幸い、核抽出液を2.5mM EDTA存在下でpre-incubateするとスプライスソーム形成だけが起こるという報告が最近なされたので（Abmayrら，1988）、今後この系を用いてスプライスソーム形成におけるキャップ構造の影響を調べていきたい。

反応の第一段階あるいは第二段階にキャップ構造が関与するかどうかを調べるには、次のような実験が考えられる。既に述べたように核抽出液を2.5mM EDTAで処理するとスプライスソーム形成だけが起こる。このスプライスソームに未処理の核抽出液を加えることによりスプライシング反応を開始させることができる。また、核抽出液をあらかじめ熱処理しておくで反応の第二段階に関与する因子が失活するため反応の第一段階だけを起こすことができる（KrainerとManiatis,1985）。第一段階を終えた反応中間体はスプライスソーム中に安定に保持されており、これに未処理の核抽出液を加えることにより反応の第二段階を開始させることができる（Sawaら，1988）。これら二種類の系を用いて、反応の第一段階あるいは第二段階におけるキャップ構造の重要性を調べることができる。すなわち、スプライスソーム形成だけが起

こった mRNA 前駆体、あるいは反応の第一段階だけが起こった中間体に存在するキャップ構造を、5' エキシンの一部に相補的な合成 DNA と RNaseH を用いて RNA 本体と切り放してからスプライシング反応を再開させ、その後の反応が効率よく起こるかどうかを調べるのである。このような実験は原理的に可能であるが、対照をとることがむずかしく実際にはかなり困難であろうと思われる。筆者自身は、スプライシング反応が開始した後にキャップ構造が関与するという可能性は低いと考えている。

本研究との関連で考えると、 $\beta$ -グロビン遺伝子のプロモーターを RNA ポリメラーゼ III のプロモーターに組替えた人工遺伝子は細胞の中でスプライシングを受けないという報告 (Sisodia ら, 1987) は非常に興味深い。この結果は幾通りもの解釈が可能であるが、 $\beta$ -グロビンの転写物にキャップ構造が形成されないことがスプライシングの起こらない原因であるのかも知れない。

#### b) 二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライシング経路

二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライシングにおいて、キャップ構造は上流側のイントロンのスプライシングを促進するが、下流側イントロンのスプライシングには影響しないことが本研究で示された。キャップ構造類似体の存在する場合や uncapped-mRNA 前駆体を用いた場合には、上流側イントロンだけが除去された中間体 (RNA A) の産生と最終産物の産生が共に阻害される。すなわち、図 3 1 に当てはめて考えると、経路 B 1 はキャップ構造の有無に関わりなくほぼ一定の効率で起こっていると考えられるが、経路 A 1 及び B 2 はキャップ構造に依存していると考えられる。経路 A 2 に関するキャップ構造依存性は明かではないが、筆者は次のような理由で経路 A 2 はキャップ構造の影響を受けていると考えている。

1) A 1 と A 2 の反応が独立に起こるとすると、RNA A は通常の単独のイントロンを持つ mRNA 前駆体と同じであるので、キャップ構造の影響を受けると考えたほうが自然である。

2) キャップ構造を持つ  $\delta$  EX 13-14-15 のスプライシングをキャップ構造類似体で阻害する際に、最終産物の産生の方が RNA A の産生よりも強く阻害される (図 1 7 B)。これは A 1 と A 2 の経路が共に阻害されている



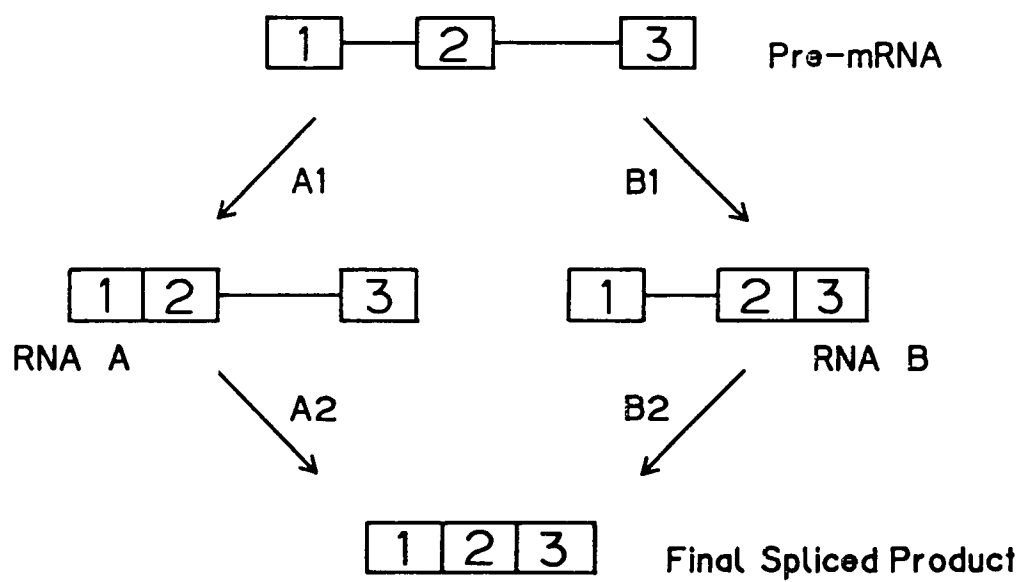


図 3 1. 二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライシング経路。  
 三つのエキソン（1 - 3）と二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライ  
 シング経路を、模式的に示した。

ためであると考えることができる。

3) 同様に、GpppG をプライマーにして合成した  $\delta$  EX 13-14-15 のスプライシングは SAHC により阻害されるが、やはり最終産物の産生の方が RNA A の産生よりも強く阻害される (図 18)。

図 3 1 に示した四つの反応は全く独立に起こるのであろうか。例えば、A 1 と B 1 の反応は独立に起こっていると考えられる。しかし、例えば A 1 の反応が起こった後に A 2 の反応が起こる場合、A 2 はスプライスソーム形成を一からやり直すのではなく、A 1 で形成されたスプライスソームを部分的に利用するという可能性もあるかも知れない。しかし、このような可能性を実験的に検証することは困難であろう。

二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体のスプライシングにおいて、キャップ構造を持たないときには下流側のスプライシング (B 1) の方が上流側 (A 1) よりも効率が良いという現象が本研究で用いたすべての mRNA 前駆体でみられた。このことの理由は明かではないが、B 1 の反応の場合は上流側の二つのエキソンおよびその間のイントロンが全体として一つの大きな 5' エキソンとしてスプライシングが起こっているのに対して、A 1 の場合は、下流の二つのエキソンおよび一つのイントロンが一つの 3' エキソンとして反応が起こっていると考えられる。このことが効率の違いの原因なのかも知れない。もう一つの考え方は、一つの mRNA 前駆体上にスプライス部位が 2 セットある場合は、何らかの理由で下流側のスプライス部位のセットの方が良く認識されるという可能性である。この可能性はキャップ構造の促進効果のところで再び述べる。これらのことを考えると、たとえ同一のイントロンを二つ持つ mRNA 前駆体の場合でも両方のイントロンが同じスプライシング効率であるとは言えなくなる。

最終産物に到るスプライシング経路は、RNA A を介する経路と RNA B を介する経路の二つがあるが、どちらの経路がメジャーなのかという問題がある。(実験結果) の章においては、uncapped mRNA 前駆体を用いた場合やキャップ構造類似体の存在する場合に RNA A の産生と最終産物の産生が共に阻害されるので、mRNA 前駆体がキャップ構造を持つ場合には RNA A を介する経路が主な経路であろうという考察を述べたが、このような考察は厳密性に欠ける。何

故なら、キャップ構造がないと経路 B 2 も遮断されると考えられるからである。おそらく次のような議論は可能であろう。RNA B を介する下流側からの経路に注目しよう。B 1 の反応はキャップ構造に関わりなく一定の効率で起こっていると仮定すると、 $m^7G$ -mRNA前駆体のスプライシングにおける B 2 の反応をキャップ構造類似体等で遮断した場合、B 2 の反応の分だけ RNA B の量が増加するはずである。例えば、 $\delta EX 13 - 14 - 15$  mRNA前駆体の場合、 $m^7G$ -mRNA前駆体に比べて uncapped-mRNA前駆体の方が RNA B の産生がやや増加している（図 14）。つまり、 $m^7G$ -mRNA前駆体のスプライシングにおいては、その RNA B の増加分だけ B 2 の反応（すなわち、RNA B を介した最終産物の産生）が起こっていると考えられる。このやや乱暴な議論を本研究で用いた mRNA前駆体に適用すると、 $m^7G$ - $\delta EX 13 - 14 - 15$  mRNA前駆体や  $m^7G$ - $\delta EX 14 - 15 \cdot 13 - 14$  mRNA前駆体の場合は RNA B を介した最終産物の産生は 10 % 以下であり、大部分の最終産物は RNA A を介して産生されていることになる。また、卵母細胞核への微量注入の系における  $m^7G$ - $\delta EX 14 - 15 \Delta N / 14 - 15$  mRNA前駆体のスプライシングにおいても最終産物の 70 % 程度が RNA A を介して産生されているという結果になる。これらの議論は、経路 B 1 がキャップ構造の有無に関わりなく一定の効率で起こっているという仮定で行った。しかし、キャップ構造依存的な経路が遮断された時は、経路 B 1 の反応に関与し得るスプライシング因子の数が実質的に増加することになるので、キャップ構造がない時の方が B 1 の反応はより効率よく起こり得ると考えることもできる。もしそれが正しいのなら、RNA B を介して最終産物が産生される割合はさらに少ないということになる。ほぼ同等のスプライシング効率の二つのイントロンを持つ mRNA前駆体のスプライシングにおいて、大部分の最終産物が RNA A を介して産生されるということは当然のことのように筆者には思われる。なぜなら、RNA A を介する経路は A 1, A 2 の反応の両方がキャップ構造によって促進されるのに対して、RNA B を介する経路では B 2 だけしか促進されないからである。しかしながら、二つのイントロンを持つ mRNA前駆体において最終産物の産生の主な経路は上流側からの経路であるというこの結果はどんな mRNA前駆体にも適用できるのであろうか。このことは、キャップ構造が存在する場合 A 1 の反応は B

1 の反応よりも効率がよいという本研究で得られた結果が、すべての mRNA 前駆体に当てはまるかという問題とつながっている。筆者の考えは否定的である。本研究で用いた mRNA 前駆体に含まれる二つのイントロンはすべて同程度の効率を持っていることに注目すべきである。もし上流側のイントロンのスプライシング効率が極端に悪い場合は、たとえキャップ構造の促進効果があっても B 1 の方が A 1 よりも効率よく起こることもあり得るであろう。実際、下流側イントロンのほうが先に除去されるという例もアデノウイルスで報告されている (Gattoni ら, 1986)。そのような場合は最終産物は主に RNA B を介して産生されると考えるのが自然であろう。この問題も実証可能なので今後確かめていきたい。

本研究の他に、複数のイントロンを持つ mRNA 前駆体の *in vitro* スプライシングの経路に関する報告が、筆者の知る限り三つある (Lang ら, 1985; Lang と Spritz, 1987; Christofori ら, 1987)。しかし、いずれもキャップ構造の効果には全く注目しておらず、また各イントロンの固有のスプライシング効率の違いが考慮に入られていないので、本研究と比較することはあまり意味がないと思われる。ただ、Christofori らの報告の中の二つのイントロンにおいてスプライスソームが同時にしかも独立に形成され得るという結果は注目に値する。筆者らの系の二つのイントロンを持つ mRNA 前駆体を用いて、しかもキャップ構造の影響も含めて、このことを追試してみることは非常に意味のあることであろう。

本研究で用いたすべての mRNA 前駆体のスプライシングにおいて、*in vitro* 系、微量注入の系を問わずエキソジャンプは全く検出できなかった。このことは、エキソジャンプを防止する機構がスプライシング機構そのものにあることを示していると思われる。

### c) 核内キャップ構造結合蛋白

筆者は、キャップ構造を持つ RNA をプローブとするゲル移動度シフト法を開発することにより、HeLa 細胞核抽出液中にキャップ構造結合蛋白を同定し、それを homogeneity にまで精製することに成功した。この蛋白 (CAPRECON) は SDS ゲル電気泳動で約 8 万ダルトンの分子量を示した。CAPRECON はキャッ

プ構造に特異的に安定に結合し、その結合にはblocking guanosineの7位のメチル基が重要であることが明らかになった。また、5'-ppp-5'のblocking構造も部分的に重要であることが示唆された。このことと関連して、CAPRECONがsnRNAに存在するtrimethylguanosineのキャップ構造に結合するかどうかは大変興味のあるところである。このことも今後調べていきたい。また、CAPRECONと同様の活性は、ニワトリ脳の核抽出液やマウスのリンパ球系の培養細胞の核抽出液等にも検出されており（データは示さず）、高等生物の核に広く分布していることが示唆される。

CAPRECONがスプライシングに関与しているという証拠は今のところ得られていない。しかし、CAPRECONが部分的にせよスプライシング因子であるU2snRNPと会合しているという結果が得られたことから、その可能性は充分あると考えられる。精製したCAPRECONを用いてマウスを免疫して抗体を得ようとする試みを行ったが、今のところ成功していない。現在、CAPRECONのアミノ酸配列を解析しており、それが決定されればCAPRECONのcDNAの単離が可能になる。更にcDNAを用いた大腸菌によるCAPRECONの大量合成が可能になるので、これを用いて抗体を調製し、CAPRECONのスプライシングへの関与を調べる予定である。

本研究において行ったゲル移動度シフト法によっては、HeLa細胞核抽出液中にCAPRECON以外のキャップ構造結合因子は検出できなかった。このことは、HeLa細胞核抽出液中にCAPRECON以外のキャップ構造結合因子が存在しないということを必ずしも意味しない。例えば、蛋白合成の際に働く細胞質の25キロダルトンのキャップ構造結合蛋白（eIF4E）が同定されている（Rhoadsの総説，1988）。この蛋白はリボソームのhigh salt washフラクションに存在するはずであるが、ゲル移動度シフト法では全く検出されない（図25）。このことの原因はおそらくゲル移動度シフト法では強い安定な結合しか検出できないことによるのだと思われる。実際、eIF4Eとキャップ構造との結合はかなり弱いことが知られている（Rhoadsの総説，1988）。HeLa細胞核抽出液中に存在するキャップ構造に弱く結合するような因子はこのアッセイ法では見逃している可能性がある。

本研究以外に核内のキャップ構造結合因子に関する報告が二つある。Patz

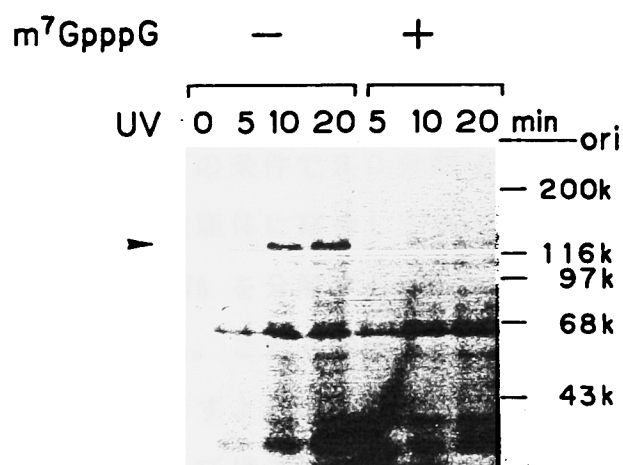


図 3 2. キャップ構造を標識した  $\delta$  E X 1 4 - 1 5 mRNA 前駆体と、核抽出液中の蛋白の、UV による crosslinking.

100  $\mu$ M の  $m^7$ GpppG 存在下 ( - )、あるいは非存在下 ( + ) で 3 0  $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 5 分間 pre-incubate した HeLa 細胞核抽出液と、キャップ構造を標識した  $\delta$  E X 1 4 - 1 5 mRNA 前駆体を混合し、in vitro スプライシングの条件で 3 0  $^{\circ}$ C  $\cdot$  3 0 分間 インキュベートした。インキュベーション後、レーン上に示すような所定の時間だけ UV を照射した。UV 照射した反応液は、RNase 処理した後、10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し、オートラジオグラムをとった。同じゲルで泳動した蛋白分子量マーカーの位置を、図の右側に示した。キャップ構造に特異的な 1 2 万ダルトンの蛋白のバンドを、arrowhead で示した。

elt らは、ラベルしたキャップ構造類似体を用いたphoto-affinity labeling によって、HeLa細胞中に分子量120,89および80キロダルトンの三つのキャップ構造結合蛋白を同定した (Patzeltら, 1983)。また、RozenとSonenbergは、UV-crosslinking によってHeLa細胞核抽出液中に115 と20キロダルトンのキャップ構造結合蛋白を同定している (RozenとSonenberg, 1987)。CAPRECONは、おそらく Patzeltらが同定した80キロダルトンの蛋白と同じものであろうと考えられる。筆者もUV-crosslinking 法によって、CAPRECON以外のキャップ構造結合蛋白をHeLa細胞核抽出液中に同定することを試みた。標識されていないppp- $\delta$  E X 1 4 - 1 5 mRNA前駆体を、 $[\alpha - ^{32}\text{P}]$  GTP とvaccinia virus guanylyltransferaseを用いてcapping することにより、キャップ構造だけが標識されたmRNA前駆体を調製した。このmRNA前駆体をHeLa細胞核抽出液とin vitroスプライシングの条件で30分間インキュベートし、そこにUVを照射することによりmRNA前駆体に結合している蛋白をRNA にcrosslink させた。RNase 処理によってRNA を分解すると、キャップ構造に結合していた蛋白が標識されることになる。これらの蛋白をSDS ゲル電気泳動によって解析するのである。図32に示すように、分子量約120,65,35 および30キロダルトンの四つの蛋白がキャップ構造にcrosslink された。しかし、核抽出液をキャップ構造類似体で前処理しておくで120 キロダルトンのバンドだけが消失することから、120 キロダルトンの蛋白がキャップ構造特異的に結合していることが分かる。この結果から、この蛋白がin vitroスプライシングの条件でmRNA前駆体のキャップ構造に結合することが明らかになった。この蛋白は PatzeltらとRozenとSonenbergが、それぞれ120あるいは115キロダルトンと同定した蛋白とおそらく同じものであろうと思われる。しかし、このUV-crosslink法にも限界があることが分かった。すなわち、CAPRECONとm<sup>7</sup>G-probe の結合はゲル移動度シフト法では感度良く検出されるが、UV-crosslink法ではほとんど検出されない (データは示さず)。各方法の限界を認識するべきであろう。これらの核内キャップ構造結合蛋白のどれがスプライシングに関与しているかを明らかにするためには、その蛋白を精製することが必要である。これらの蛋白の中で、精製され、その性質が明らかになったのはCAPRECONだけである。これらのキャップ構造結合蛋白の生物学的機能を明

らかにすることは今後の課題として残されている。

#### d) キャップ構造によるスプライシングの促進機構

キャップ構造によるスプライシングの促進機構については今のところ全く不明であるが、いくつかのモデルを考えることはできる（図33）。Aのモデルは、キャップ構造が、スプライシング反応に必要なmRNA前駆体の二次構造のunwindingに関与しているというモデルである。このモデルは、保存された二次構造をとるようなRNA、例えばrRNAやtRNAにはキャップ構造がないというところから発想したものである。このモデルでは、RNA helicaseがキャップ構造あるいはキャップ構造に結合しているキャップ構造結合蛋白を標的にしてmRNA前駆体に結合し、その下流のRNAをunwindするというふうを考える。キャップ構造結合蛋白そのものがhelicaseであってもよいのかも知れない。もし、このモデルが正しいのなら、HeLa細胞核抽出液中にはキャップ構造に依存したRNA helicaseが存在するはずである。しかし、筆者らはHeLa細胞核抽出液中に弱いRNA helicase活性を検出したが、その活性はキャップ構造に非依存的であった（データは示さず）。

キャップ構造のスプライシングの促進効果は、mRNA前駆体が単一のイントロンを含む場合は3-4倍程度であるが、二つのイントロンを持つmRNA前駆体の上流側イントロンに対しては20-30倍も促進する（図14）。このことは、一つのmRNA前駆体上で複数のスプライス部位が競合している場合に、キャップ構造の効果が顕著になるということを示唆している。モデルBは、スプライス部位のscanning mechanismのentryをキャップ構造が促進するというモデルである。単一のイントロンしか持たないmRNA前駆体においては、スプライス部位がもともと1セットしかないのでキャップ構造の促進効果が弱くしか出ない。二つのイントロンを持つmRNA前駆体においては、キャップ構造を持たないときにはなぜか下流側のイントロンの方が効率よく除去されるという現象がある（図14C、図16B、図23）。このことから考えて、キャップ構造がない場合には（よく分からない理由によって）下流側のイントロンのスプライス部位が主に搜し出されるが、上流側イントロンのスプライス部位はなぜかscanning mechanismによってほとんど認識されないのかも



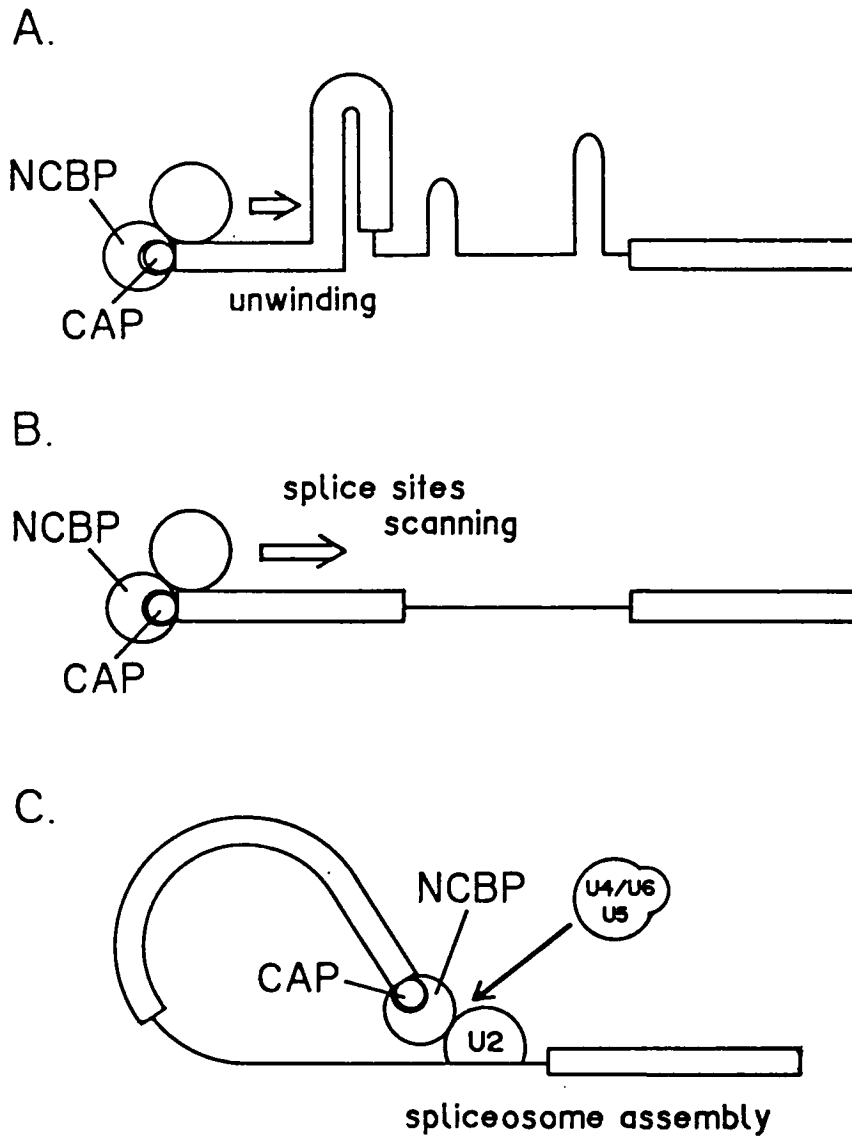


図 3 3. キャップ構造によるスプライシングの促進機構に関する三つのモデル。

( A ) キャップ構造が、 mRNA前駆体の二次構造のunwinding に関与するというモデル。( B ) キャップ構造が、 スプライス部位のscanning mechanismの entry 部位であるというモデル。( C ) キャップ構造が、 スプライスソーム形成に関与するというモデル。

知れない。キャップ構造がある場合には、scanning mechanismがキャップ構造からentryしてくるので上流のイントロンのスプライス部位が下流のイントロンよりもよく認識されるようになると思うのである。このモデルは魅力的ではあるが、scanning mechanismが存在するという実験的証拠は今のところない。

Cのモデルは、キャップ構造あるいはそれに結合した蛋白がスプライシング因子の集合を助けるというモデルである。スプライスソーム形成がキャップ構造に依存しているという報告(Patzeltら,1987)は、このモデルを支持するかのようと思われるが、この報告はAやBのモデルと必ずしも矛盾するわけではない。しかし、本研究によって同定されたCAPRECONがU2snRNPと会合しているという結果を合わせて考えると大変興味深い。ひょっとしたら、キャップ構造に結合するCAPRECONとブランチ部位に結合するU2が会合しているということが、5'スプライス部位と3'スプライス部位が会合する確率を高めているのかも知れない。もし、この考えが正しいのなら、5'エキソンが長くなるにつれて、キャップ構造の促進効果が低下して行くはずであるが、筆者の予備的な実験結果はこの考えに否定的である(データは示さず)。また、このCのモデルでは、キャップ構造あるいはそれに結合する因子が、U4/U6+U5複合体がentryしてくる時の標的になるということも考えられる。

他に、スプライシングの反応が開始された後にキャップ構造が関与し、何らかの機構で反応そのものを促進するというモデルも考えられるが、そのような可能性は薄いと筆者は考える。

#### e) キャップ構造による促進効果の限定性の問題

キャップ構造によるスプライシングの促進機構と密接に関連している重要な問題は、何故キャップ構造の効果がキャップ構造に近い側のイントロンにしか及ばないのかということである。キャップ構造の効果の限界に関して二つの考え方ができる。一つめは、キャップ構造の効果はキャップ構造からの絶対的距離が問題であり、一定の距離以下のイントロンにしか及ばないというモデル(モデル1)である。もう一つは、キャップ構造の効果は絶対的距離には関係なく、キャップ構造により近い方のイントロンに及ぶというモデ

ル（モデル2）である。これらのモデルは実験的に検証可能である。例えば、 $\delta$  EX 13 - 14 - 15 mRNA前駆体を例にとって考えると、このmRNA前駆体ではもともとキャップ構造の効果は上流のイントロンにしか及ばないのだが、上流側イントロンの両方のスプライス部位配列に変異を導入してスプライシングが起こらなくした場合、キャップ構造の効果が後ろのイントロンに及ぶようになるかどうかを調べるのである。もし、モデル1が正しいのなら、キャップ構造と後ろのイントロンの距離は変化していないので、後ろのイントロンにはキャップ構造の効果は及ばないはずである。逆にモデル2では後ろのイントロンのスプライシングがキャップ構造の影響を受けるようになるはずである。

キャップ構造の効果が5'側のイントロンにしか及ばないということの背景にある機構に関して、もう一つの疑問が湧く。例えば $\delta$  EX 13 - 14 - 15 mRNA前駆体のエキソン13をどんどん長くして行ったらキャップ構造の効果はどうなるのだろうかという疑問である。上述のモデル1が正しいなら、ある程度の長さになるとキャップ構造の効果は二つのイントロンのいずれにも及ばなくなるはずである。キャップ構造と二つのイントロンの距離が近似的に等しくなるぐらいまでエキソン13を長くしたら、キャップ構造の効果はどうなるのであろうか。もし、図33のモデルBのようにキャップ構造からのscanningがあるとしたら、キャップ構造の効果はやはり上流側のイントロンにしか及ばないであろう。しかし、キャップ構造の促進効果が上流のイントロンにしか及ばないという現象が、キャップ構造と各イントロンがランダムに衝突する確率が上流側のイントロンの方がはるかに高いことに起因しているとすれば、エキソン13を充分長くすればキャップ構造と衝突する確率は二つのイントロンで同じになるはずであるから、キャップ構造の効果は二つのイントロンに分配されるか、あるいはキャップ構造の効果が希釈されて消失してしまうかのどちらかが起こるはずである。

以上に述べた実験は実際に実施可能なものも多々あるので、今後、実験的にキャップ構造の促進効果の実体を探っていきたい。

## 第 V 章 今後の課題

最後に、mRNAスプライシングの研究における今後の課題と思われるものについて、筆者の考えを簡単に述べて、この博士論文の締めくくりとしたい。

### a) mRNAスプライシングと核マトリクス

核マトリクスは、元来、DNaseとRNase処理をした核を高濃度の塩と界面活性剤で洗った後に残る不溶性の構造物と定義されるが、主に蛋白性の繊維の internal network から成っていて、形態的には核の形を保持している。核マトリクスは、DNA 複製や転写、およびRNA プロセッシングの起こる場所であると示唆されてきた (Bouteilleらの総説, 1983)。mRNA前駆体と成熟mRNAが共に核マトリクスに結合していることが示され、mRNAスプライシングは核マトリクス上で起こると考えられた (Ciejekら, 1982)。Zeitlin らは、核マトリクスに結合したウサギβ-グロビンのmRNA前駆体のスプライシング反応が *in vitro* でチェイスできることを明かにし、スプライシングが核マトリクス上で起こることの直接的な証拠を示した (Zeitlinら, 1987; Zeitlinら, 1988)。今後のmRNAスプライシングの研究は、核抽出液一辺倒から卒業して、核マトリクスとの関係で考えるべきである。つまり、より *in vivo* に近い方向を模索するべきであると思う。このことと関連して、mRNA前駆体がどのような因子を介して核マトリクスに結合しているかを調べることは重要であると筆者は考えている。これはmRNAの核から細胞質への輸送とも関連した問題であるに違いない。mRNAが核マトリクスに結合している限りは、決して細胞質へは輸送され得ないのだから。

### b) Catalystの実体

mRNAスプライシングとグループ II イントロンのセルフスプライシングとの類似性から、mRNAスプライシング反応もRNA 触媒である可能性が指摘されている (Cechらの総説, 1986)。もしそうであれば、catalystはsnRNA であるに違いない。どのsnRNA が触媒活性を持っているかを調べることは一つの新しい方向である。もちろん、特定のsnRNA だけでスプライシング反応が起こ

ることを期待するのは無理であろう。しかし、ある限られた条件で、特定の snRNA に何らかの触媒活性、例えば RNA の切断活性があることは期待してもいいと思う。どの snRNA が catalystかを推理してみよう。スプライスソームの中にある snRNA は、U1(?), U2, U4, U5, U6 であるが、スプライス部位の認識機能と触媒活性は異なる分子に担われているに違いないという筆者の独断と偏見によって U1, U2, U5 は除外しよう。また、U4 は、反応が起こる前にスプライスソームから解離すると考えられるので、これも除外する。とすると、catalyst は U6RNA であるということになる。スプライシングに関与する snRNA の内で、U6RNA の配列は種間で最も保存されている (Reddy, 1988)。また、U6RNA だけは trimethylguanosine のキャップ構造を持たないという点で、特異な存在のように思われる。ATP の要求性も含めて、筆者が考える mRNA スプライシングのシナリオは次の通りである。mRNA 前駆体の二次構造が ATP 依存的に解きほぐされて、U1?, U2, U5, U4/U6 を含むスプライスソームが形成される。この時点では、U6RNA は U4RNA と塩基対を形成しているため活性のある高次構造を取れないでいる。次に、RNA helicase が、U4/U6 間の塩基対を ATP 依存的に解きほぐし、U4 がスプライスソームから解離する。U4 が離れたため U6RNA は活性のある構造を取れるようになり、反応の第一段階が起こる。次に、ATP のエネルギーを使ってスプライスソームの構造がゆがめられ、それによって U6RNA の活性中心が 3' スプライス部位に接近することになり、反応の第二段階が起こる。このシナリオを眺めていると、catalyst の問題だけでなく、ATP が何のために使われているのかを理解することもスプライシング反応を理解する上で重要なことであると思われる。

### c) スプライス部位の選択の問題

mRNA スプライシングを、スプライス部位の選択と反応機構の二つに分けることが許されるとしたら、後者は前者に比べるとはるかに簡単な問題であるように思われる。序論で述べたように、スプライシングに関与する因子は多数同定されているが、スプライス部位の選択の機構に関しては古くから多くの研究者が関心を寄せてきたにもかかわらず全く不明である。反応機構が解明されてもスプライス部位の選択の機構が解明されなければ、mRNA スプライ

シングを理解したとは言えない。また、スプライス部位選択機構を理解することは、スプライス部位の選択の原則をしばしば無視することによって成し遂げられるalternative splicingの機構を理解することにもつながるものと期待される。スプライス部位選択の問題はmRNAスプライシングにおける巨大な問題としてそびえ立っており、今後多くの研究がなされる必要がある。

#### d) mRNAスプライシングにおける調節

異なる組織や発生段階で異なるスプライス部位が選択され、1つの遺伝子から複数種のmRNAが産生されるalternative splicingの例が多数報告されていることは序論で述べた。異なる組織や、異なる発生段階の生物から細胞抽出液を調製し、alternative splicingをin vitro系で再現しようとする試みが多く、研究グループでなされているが、今のところ成功していない。ショウジョウバエにおいては、ある遺伝子の産物が別の遺伝子のスプライシングを調節している例がいくつか知られている（Binghamらの総説,1988）。例えば、性決定に関わるSex-lethalという遺伝子の産物がtransformer 遺伝子の転写物のスプライシングを調節しているらしいことが分かっている。ショウジョウバエにおける遺伝学と生化学の組合せは、alternative splicingの機構を理解する上で強力な武器になるに違いない。alternative splicingの機構の獲得と単細胞生物から多細胞生物への進化の間には、深い関係があるように思う。スプライシングの調節機構を理解することは、高等生物の発生や細胞分化を理解する上での重要な一つの手がかりになるのかも知れない。

## 謝辞

五年間にわたる指導だけでなく、私を実力以上に盛り立てて下さり、様々なチャンスを与えて下さった志村令郎教授に心から感謝します。学ぶことの多かった大学院生活でした。

大学院に戻ってくる際に色々と相談にのって下さり、別の研究室になっても、小関研のサロンにおいて様々な議論をして下さった小関治男教授に感謝します。

安田国雄博士には、実際の実験の進め方等に関する多数の助言をいただいたことをはじめ、公私にわたり色々お世話になりました。井口八郎博士は、筆者の研究生生活の出発点において、分子遺伝学の基礎を教えてくださいました。また、坂本博博士は、本研究を始めるきっかけを作って下さった他、実験上の問題点に関する良き相談相手となって下さいました。感謝します。白石英秋博士は、実験のアイデア等に関する様々な議論につき合ってくれました。白石博士と偶然同じ研究室に入ったことは色々な意味で好運であったと思っています。

三森経世博士、J. A. Steitz博士、そして水本清久博士は、貴重な血清、あるいはcapping 酵素等を快く分与して下さいました。感謝します。本研究における微量注入実験は大学院生の井上邦夫君によって行われました。ここに明記すると共に謝意を表します。また、その他の志村研究室の大学院生の方々にも色々とお世話になり、ありがとうございました。

最後になりましたが、今まで私を自由にさせてくれた両親に心から感謝し、本論文を捧げます。

## 文献

Abmayr, S.M., Reed, R. and Maniatis, T (1988)

Identification of a functional mammalian spliceosome containing unspliced pre-mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7216-7220.

Aebi, M., Hornig, H., Padgett, R.A., Reiser, J. and Weissmann, C. (1986)

Sequence requirements for splicing of higher eukaryotic nuclear pre-mRNA. Cell 47, 555-565.

Aebi, M., Hornig, H. and Weissmann, C. (1987)

5' cleavage site in eukaryotic pre-mRNA splicing is determined by the overall 5' splice region, not by the conserved 5'GU. Cell 50, 237-246.

Arnberg, A.C., Van der Horst, G. and Tabak, H.F. (1986)

Formation of lariats and circles in self-splicing of precursor to the large ribosomal RNA of yeast mitochondria. Cell 44, 235-242.

Berget, S.M., Moore, C. and Sharp, P.A. (1977)

Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3171-3175.

Berget, S.M. and Robberson, B.L. (1986)

U1, U2 and U4/U6 small nuclear ribonucleoproteins are required for in vitro splicing but not polyadenylation. Cell 46, 691-696.

Bina, M., Feldmann, R.J. and Deeley, R.G. (1980)

Could poly(A) align the splicing sites of messenger RNA precursors? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1278-1282.

Bindereif, A. and Green, M.R. (1986)

Ribonucleoprotein complex formation during pre-mRNA splicing in vitro. Mol. Cell. Biol 6, 2582-2592.



Bindereif, A. and Green, M.R. (1987)

An ordered pathway of snRNP binding during mammalian pre-mRNA splicing complex assembly. EMBO J. 6, 2415-2424.

Bingham, P.M., Chou, T.-B., Mims, I. and Zachar, Z. (1988)

On/off regulation of gene expression at the level of splicing. Trends Genet. 4, 134-138.

Black, D.L., Chabot, B. and Steiz, J.A. (1985)

U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in pre-messenger RNA splicing. Cell 42, 737-750.

Black, D.L. and Steiz, J.A. (1986)

Pre-mRNA splicing in vitro requires intact U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein. Cell 46, 697-704.

Blanchard, J.-M., Weber, J., Jelinek, W. and Darnell, J.E. (1978)

In vitro RNA-RNA splicing in adenovirus 2 mRNA formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5344-5348.

Blumenthal, T. and Thomas, J. (1988)

Cis and trans mRNA splicing in C.elegans. Trends Genet. 4, 305-308.

Bouteille, M., Bouvier, D. and Seve, A.P. (1983)

Heterogeneity and territorial organization of the nuclear matrix and related structures. Int. Rev. Cytol. 83, 135-182.

Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F. and Chambon, P. (1978)

Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4853-4857

Brody, E. and Abelson, B. (1985)

The "spliceosome": Yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction.

Science 228, 963-967

- Bruzik, J.P., Van Doren, K, Hirsh, D. and Steiz, J.A. (1988)  
Trans splicing involves a novel form of small nuclear ribonucleoprotein particles. Nature 335, 559-562.
- Calvet, J.P., Meyer, L.M. and Pederson, P. (1982)  
Small nuclear RNA U2 is base-paired to heterogeneous nuclear RNA. Science 217, 456-458.
- Cech, T.R. (1986)  
The generality of self-splicing RNA : Relationship to nuclear mRNA splicing. Cell 44, 207-210.
- Chabot, B., Black, D.L., LeMaster, D.M. and Steiz, J.A. (1985)  
The 3' splice site of pre-messenger RNA is recognized by small nuclear ribonucleoprotein. Science 230, 1344-1349.
- Choi, Y.D., Grabowski, P.J., Sharp, P.A. and Dreyfuss, G. (1986)  
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins : Role in RNA splicing. Science 231, 1534-1539.
- Chow, L.T , Gelinas, R.E., Broker, T.R. and Roberts, R.J (1977)  
An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. Cell 12, 1-8.
- Christofori, G., Frendewey, D. and Keller, W. (1987)  
Two spliceosomes can form simultaneously and independently on synthetic double-intron messenger RNA precursors.  
EMBO J. 6, 1747-1755.
- Chu, G. and Sharp, P.A. (1981)  
A gene chimaera of SV40 and mouse  $\beta$ -globin is transcribed and properly spliced. Nature 289, 378-382.
- Ciejek, E.M., Nordstrom, J.L., Tsai, M.-J and O'Malley, B.W. (1982)  
Ribonucleic acid precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix. Biochemistry 21, 4945-4953.
- Contreras, R., Cheroutre, H., Degrave, W. and Fiers, W. (1982)  
Simple, efficient in vitro synthesis of capped RNA useful for

direct expression of cloned eukaryotic gene.

Nucleic Acids Res. 10, 6353-6362.

Davanloo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1984)

Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2035-2039.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983)

Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.

Nucleic Acids Res. 11, 1475-1489.

Dodgson, J.B. and Engel, J.D. (1983)

The nucleotide sequence of the adult chicken  $\alpha$ -globin genes. J. Biol. Chem. 258, 4623-4629.

Domdey, H., Apostol, B., Lin, R.J., Newman, A., Brody, E. and Abelson, J. (1984)

Lariat structures are in vivo intermediates in yeast pre-mRNA splicing. Cell 39, 611-621.

Edery, I. and Sonenberg, N. (1985)

Cap-dependent RNA splicing in a HeLa nuclear extract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7590-7594.

Erbil, C. and Niessing, J. (1983)

The primary structure of the duck  $\alpha^D$ -globin gene: an unusual 5' splice junction sequence. EMBO J. 2, 1339-1343.

Esumi, H., Takahashi, Y., Sato, S., Nagase, S. and Sugimura, T. (1983)

A seven-base-pair deletion in an intron of the albumin gene of analbuminemic rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 95-99.

Friendewey, D. and Keller, W. (1985)

Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences. Cell 42, 355-367

Fukumaki, Y., Ghosh, P.K., Benz Jr., E.J., Reddy, V.B.,

- Lebowitz, P., Forget, B.G. and Weissman, S.M. (1982)  
Abnormally spliced messenger RNA in erythroid cells from patients with  $\beta^+$  thalassaemia and monkey cells expressing a cloned  $\beta^+$ -thalassaemic gene. Cell 28, 585-593.
- Furneaux, H.M., Perkins, K.K., Freyer, G.A., Arenas, J. and Hurwitz, J. (1985)  
Isolation and characterization of two fractions from HeLa cells required for mRNA splicing in vitro.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4351-4355.
- Gattoni, R., Keohavong, P. and Stevenin, J. (1986)  
Splicing of the E2A premessenger RNA of adenovirus serotype 2 : Multiple pathways in spite of the entire large intron.  
J. Mol. Biol. 187, 379-397.
- Gerke, V. and Steiz, J.A. (1986)  
A protein associated with small nuclear ribonucleoprotein particles recognizes the 3' splice site of premessenger RNA.  
Cell 47, 973-984.
- Gilbert, W. (1978)  
Why genes in pieces? Nature 271, 501.
- Goldenberg, C.J. and Hauser, S.D. (1983)  
Accurate and efficient in vitro splicing of purified precursor RNAs specified by early region 2 of the adenovirus 2 genome.  
Nucleic Acids Res. 11, 1337-1348.
- Goswami, P., Szeberenyi, J., Wollenzien, P.L. and Goldenberg, C.J. (1987)  
Unwinding of the pre-mRNA secondary structure probed with psoralenis necessary for in vitro splicing.  
Abstracts of papers presented at the 1987 meeting on RNA processing, pp.90, Cold Spring Harbor Lab.
- Grabowski, P.J., Seiler, S.R. and Sharp, P.A. (1985)

- A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. Cell 42, 345-353.
- Grabowski, P.J. and Sharp, P.A. (1986)
- Affinity Chromatography of splicing complexes : U2, U5, and U4+U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in the spliceosome. Science 233, 1294-1299.
- Green, M.R., Maniatis, T. and Melton, D.A. (1983)
- Human  $\beta$ -globin mRNA synthesized in vitro is accurately spliced in Xenopus oocyte nuclei. Cell 32, 681-694.
- Green, M.R. (1986)
- Pre-mRNA splicing. Ann. Rev. Genet. 20, 671-708.
- Gurdon, J.B. (1976)
- Injected nuclei in frog oocyte: fate, enlargement, and chromatin dispersal. J. Embryol. Exp. Morphol. 36, 523-540.
- Hardy, S.F., Grabowski, P.J., Padgett, R.A. and Sharp, P.A. (1984)
- Cofactor requirements of splicing of purified messenger RNA precursors. Nature 308, 375-377.
- Hartmuth, K. and Barta, A. (1988)
- Unusual branch point selection in processing of human growth hormone pre-mRNA. Mol. Cell. Biol. 8, 2011-2020.
- Hartwell, L.H. (1967)
- Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. J. Bacteriol. 93, 1662-1670.
- Hartwell, L.H., McLaughlin, C.H. and Warner, J.R. (1970)
- Identification of ten genes that control ribosome formation in yeast. Mol. Gen. Genet. 109, 42-56.
- Henikoff, S. (1984)
- Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28, 351-359.
- Hernandez, N. and Keller, W. (1983)

- Splicing of in vitro synthesized messenger RNA precursors in HeLa cell extracts. Cell 35, 89-99.
- Hornig, H., Aeby, M and Weissman, C. (1986)  
Effect of mutations at the lariat branch acceptor site on  $\beta$ -globin pre-mRNA splicing in vitro. Nature 324, 589-591.
- Kadonaga, J.T. and Tjian, R. (1986)  
Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5889-5893.
- Keller, E.B. and Noon, W.A. (1984)  
Intron splicing : A conserved internal signal in introns of animal pre-mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7417-7420.
- King, C.R. and Piatigorsky, J. (1983)  
Alternative RNA splicing of the murine  $\alpha$ A-crystallin gene: protein-coding information within an intron. Cell 32, 707-712.
- Konarska, M.M., Padgett, R.A. and Sharp, P.A. (1984)  
Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. Cell 38, 731-736.
- Konarska, M.M., Padgett, R.A. and Sharp, P.A. (1985)  
Trans splicing of mRNA precursors in vitro. Cell 42, 165-171.
- Konarska, M.M. and Sharp, P.A. (1986)  
Electrophoretic separation of complexes involved in the splicing of precursors to mRNA. Cell 46, 845-855.
- Konarska, M.M. and Sharp, P.A. (1987)  
Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosome. Cell 49, 763-774.
- Konarska, M.M. and Sharp, P.A. (1988)  
Association of U2, U4, U5, and U6 small nuclear ribonucleoproteins in a spliceosome-type complex in absence of precursor RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5459-5462.
- Krainer, A.R., Maniatis, T., Ruskin, B. and Green, M.R. (1984)

- Normal and mutant human  $\beta$ -globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced in vitro. Cell 36, 993-1005.
- Krainer, A.R. and Maniatis, T. (1985)
- Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. Cell 42, 725-736.
- Kramer, A., Keller, W., Appel, B. and Luhrmann, R. (1984)
- The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. Cell 38, 299-307
- Kramer, A., Frick, M. and Keller, W. (1987)
- Separation of multiple components of HeLa cell nuclear extracts required for pre-messenger RNA splicing. J. Biol. Chem. 262, 17630-17640.
- Kramer, A. (1988)
- Presplicing complex formation requires two proteins and U2 snRNP Genes and Dev. 2, 1155-1167.
- Kuhne, T., Wieringa, B., Reiser, J. and Weissmann, C. (1983)
- Evidence against a scanning model of RNA splicing. EMBO J 2, 727-733.
- Laemmli, U.K. (1970)
- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lamond, A.I., Konarska, M.M., Grabowski, P.J. and Sharp, P.A. (1988)
- Spliceosome assembly involves the binding and release of U4 small nuclear ribonucleoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 411-415
- Lang, K.M. and Spritz, R.A. (1983)
- RNA splice site selection : Evidence for a 5'  $\rightarrow$  3' scanning model. Science 220, 1351-1355.)

- Lang, K.M., van Santen, V.L. and Spritz, R.A. (1985)  
The two intervening sequences of human  $\beta$ - and  $\gamma$ -globin pre-mRNAs are excised in a preferred temporal order in vitro. EMBO J. 4, 1991-1996.
- Lang, K.M. and Spritz, R.A. (1987)  
In vitro splicing pathways of pre-mRNAs containing multiple intervening sequences. Mol. Cell. Biol. 7, 3428-3437
- Langford, C.J., Klinz, F.J., Donath, C. and Gallwitz, D. (1984)  
Point mutations identify the conserved, intron-contained TACTAAC box as an essential splicing signal sequence in yeast. Cell 36, 645-653.
- Leff, S.E. and Rosenfeld, M.G. (1986)  
Complex transcriptional units : Diversity in gene expression by alternative RNA processing. Ann. Rev. Biochem. 55, 1091-1117
- Lerner, M.R., Boyle, J.A., Mount, S.M., Wolin, S.L. and Steitz, J.A. (1980)  
Are snRNPs involved in splicing? Nature 283, 220-224.
- Lerner, E.A., Lerner, M.R., Janeway, C.A. and Steitz, J.A. (1981)  
Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2737-2741.
- Lewin, B. (1980)  
Alternatives for splicing : Recognizing the ends of introns. Cell 22, 324-326.
- Lin, R.-J., Lustig, A.J. and Abelson, J. (1987)  
Splicing of yeast nuclear pre-mRNA in vitro requires a functional 40S spliceosome and several extrinsic factors. Genes Dev. 1, 7-18.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M.R. (1984)



- Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucleic Acids Res. 12, 7035-7056.
- Mimori, T., Hinterberger, M., Petterson, I and Steitz, J.A. (1984)  
Autoantibodies to the U2 small nuclear ribonucleoprotein in a patient with scleroderma-polymyositis overlap syndrome.  
J. Biol. Chem. 259, 560-565.
- Mount, S.M. (1982)  
A catalogue of splice junction sequences.  
Nucleic Acids Res. 10, 459-472.
- Mount, S.M., Petterson, I., Hinterberger, M., Karmas, A. and Steitz, J.A. (1983)  
The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro. Cell 33, 509-518.
- Murphy, W.J., Watkins, K.P. and Agabian, N. (1986)  
Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing : Evidence for trans splicing.  
Cell 47, 517-525.
- Nakajima, N., Ozeki, H. and Shimura, Y. (1982)  
In vitro transcription of the supB-E tRNA operon of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 257, 11113-11120.
- Nawa, H, Kotani, H and Nakanishi, S. (1984)  
Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. Nature 312, 729-734.
- Newman, A.J., Lin, R., Cheng, S. and Abelson, J (1985)  
Molecular consequences of specific intron mutations on yeast mRNA splicing in vivo and in vitro. Cell 42, 335-344.
- Ohno, M., Sakamoto, H., Yasuda, K., Okada, T.S. and Shimura, Y (1985)  
Nucleotide sequence of a chicken  $\delta$ -crystallin gene.

- Nucleic Acids Res. 13, 1593-1606.
- Ohno, M., Sakamoto, H. and Shimura, Y (1987)  
Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5187-5191.
- Ohshima, Y., Itoh, M., Okada, N. and Miyata, T (1981)  
Novel models for RNA splicing that involve a small nuclear RNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4471-4474.
- Padgett, R.A., Hardy, S.F. and Sharp, P.A. (1983a)  
Splicing of adenovirus RNA in a cell-free transcription system.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5230-5234.
- Padgett, R.A., Mount, S.M., Steiz, J.A. and Sharp, P.A. (1983b)  
Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. Cell 35, 101-107
- Padgett, R.A., Konarska, M.M., Gravowski, P.J., Hardy, S.F. and Sharp, P.A. (1984)  
Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. Science 225, 898-903.
- Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiler, S. and Sharp, P.A. (1986)  
Splicing of messenger RNA precursors.  
Ann. Rev. Biochem. 55, 1119-1150.
- Patzelt, E., Blaas, D. and Kuechler, E. (1983)  
CAP binding proteins associated with the nucleus.  
Nucleic Acids Res. 11, 5821-5835.
- Patzelt, E., Thalmann, E., Hartmuth, K., Blaas, D. and Kuechler, E. (1987)  
Assembly of pre-mRNA splicing complex is cap dependent.  
Nucleic Acids Res. 15, 1387-1399.
- Perkins, K.K., Furneaux, H.M. and Hurwitz, J (1986)

- RNA splicing products formed with isolated fractions from HeLa cells are associated with fast-sedimenting complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 887-891.
- Rautmann, G. and Breathnach, R. (1985)  
A role for branchpoints in splicing in vivo.  
Nature 315, 430-432.
- Reddy, R. (1988)  
Compilation of small RNA sequences.  
Nucleic Acids Res. 16, 71-85.
- Reed, R. and Maniatis, T. (1986)  
A role for exon sequences and splice-site proximity in splice-site selection. Cell 46, 681-690.
- Reed, R., Griffith, J. and Maniatis, T. (1988)  
Purification and visualization of native spliceosomes.  
Cell 53, 949-961.
- Reed, R. and Maniatis, T. (1988)  
The role of the mammalian branchpoint sequence in pre-mRNA splicing. Genes Dev. 2, 1268-1276.
- Rhoads, R.E. (1988)  
CAP recognition and the entry of mRNA into the protein synthesis initiation cycle. Trends Biol. Sci. 13, 52-56.
- Rodriguez, J.R., Pikielny, C.W. and Rosbash, M. (1984)  
In vivo characterization of yeast mRNA processing intermediates. Cell 39, 603-610.
- Rogers, J. and Wall, R. (1980)  
A mechanism for RNA splicing.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1877-1879.
- Rozen, F. and Sonenberg, N. (1987)  
Identification of nuclear cap specific proteins in HeLa cells.  
Nucleic Acids Res. 15, 6489-6500.

- Ruskin, B., Krainer, A.R., Maniatis, T and Green, M.R. (1984)  
Excision of an intact introns as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. Cell 38, 317-331.
- Ruskin, B. and Green, M.R. (1985)  
Role of the 3' splice site consensus sequence in mammalian pre-mRNA splicing. Nature 317, 732-734.
- Ruskin, B., Zamore, P.D. and Green, M.R. (1988)  
A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. Cell 52, 207-219.
- Ryffel, G.U., Wyler, T., Muellener, D.B. and Weber, R. (1980)  
Identification, organization and processing intermediates of the putative precursors of Xenopus vitellogenin messenger RNA. Cell 19, 53-61.
- Sakamoto, H. (1986)  
Studies on RNA splicing in vitro: Splicing of crystallin mRNA precursors. A thesis submitted to the graduate school of Kyoto University. Kyoto, Japan.
- Sakamoto, H., Ohno, M., Yasuda, K., Mizumoto, K. and Shimura, Y. (1987)  
In vitro splicing of a chicken  $\delta$ -crystallin pre-mRNA in a mammalian nuclear extract. J. Biochem. 102, 1289-1301.
- Sawa, H., Ohno, M., Sakamoto, H. and Shimura, Y (1988)  
Requirement of ATP in the second step of the pre-mRNA splicing reaction. Nucleic Acids Res. 16, 3157-3164.
- Sharp, P.A. (1981)  
Speculations on RNA splicing. Cell 23, 643-646
- Sharp, P.A. (1987)  
Splicing of messenger RNA precursors. Science 235, 766-771.
- Sierakowska, H., Szer, W., Furdon, P.J and Kole, R. (1986)  
Antibodies to hnRNP core proteins inhibit in vitro splicing of

- human  $\beta$ -globin pre-mRNA. Nucleic Acids Res. 14, 5241-5254.
- Sisodia, S.S., Sollner-Webb, B. and Cleveland, D.W. (1987)  
 Specificity of RNA maturation pathways : RNAs transcribed by  
 RNA polymerase III are not substrates for splicing or  
 polyadenylation. Mol. Cell. Biol. 7, 3602-3612.
- Solnick, D. (1985a)  
Trans splicing of mRNA precursors. Cell 42, 157-164.
- Solnick, D. (1985b)  
 Alternative splicing caused by RNA secondary structure.  
Cell 43, 667-676.
- Solnick, D. (1987)  
 Intron tracking is not required to bring pre-mRNA splice sites  
 together. Abstracts of papers presented at the 1987 meeting on  
 RNA processing, pp.85, Cold Spring Harbor Lab.
- Sutton, R.E. and Boothroyd, J.C. (1986)  
 Evidence for trans splicing in trypanosomes. Cell 47, 527-535.
- Sutton, R.E. and Boothroyd, J.C. (1988)  
 The cap of both miniexon-derived RNA and mRNA of trypanosomes  
 is 7-methylguanosine. Mol. Cell. Biol. 8, 494-496.
- Swanson, M.S. and Dreyfuss, G. (1988)  
 RNA binding specificity of hnRNP proteins :  
 A subset bind to the 3' end of introns. EMBO J 7, 3519-3529.
- Tatei, K., Takemura, K., Mayeda, A., Fujiwara, Y., Tanaka, H.,  
 Ishahama, A. and Ohshima, Y (1984)  
 U1 RNA-protein complex preferentially binds to both 5' and  
 3' splice junction sequences in RNA or single-stranded DNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6281-6285.
- Tazi, J., Alibert, C., Temsamani, J , Reveillaud, I , Cathala, G.,  
 Brunel, C. and Jeanteur, P (1986)  
 A protein that specifically recognizes the 3' splice site of

- mammalian pre-mRNA introns is associated with a small nuclear ribonucleoprotein. Cell 47, 755-766.
- Thomas, J.D., Conrad, R.C. and Blumenthal, T. (1988)  
The C.elegans trans-spliced leader RNA is bound to Sm and has a trimethylguanosine cap. Cell 54, 533-539.
- Trapnell, B.C., Tolstoshev, P. and Crystal, R.G. (1980)  
Secondary structure for splice junction in eukaryotic and viral messenger RNA precursors. Nucleic Acids Res. 8, 3659-3672.
- Treisman, R., Orkin, S.H. and Maniatis, T. (1983)  
Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned  $\beta$ -thalassaemia genes. Nature 302, 591-596.
- Tsai, M.-J., Ting, A.C., Nordstrom, J.L., Zimmer, W and O'Malley, B.W. (1980)  
Processing of high molecular weight ovalbumin and ovomucoid precursor RNAs to messenger RNA. Cell 22, 219-230.
- Van der Ploeg, L.H.T. (1986)  
Discontinuous transcription and splicing in trypanosomes. Cell 47, 479-480.
- Van Santen, V L. and Spritz, R.A. (1985)  
mRNA precursor splicing in vivo: Sequence requirements determined by deletion analysis of an intervening sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2885-2889.
- Wallace, J.C. and Edmonds, M. (1983)  
Polyadenylated RNA contains branches. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 950-954.
- Weber, S. and Aebi, M. (1988)  
In vitro splicing of mRNA precursors : 5' cleavage site can be predicted from the interaction between the 5' splice region and 5' terminus of U1 snRNA. Nucleic Acids Res. 16, 471-486.
- Wieringa, B., Meyer, F., Reiser, J. and Weissmann, C. (1983)

Unusual splice sites revealed by mutagenic inactivation of an authentic splice site of the rabbit  $\beta$ -globin gene.

Nature 301, 38-43.

Wieringa, B., Hofer, E. and Weissmann, C. (1984)

A minimal intron length but no specific internal sequence is required for splicing the large rabbit  $\beta$ -globin intron.

Cell 37, 915-925.

Wollenzien, P.L., Goswami, P., Teare, J., Szeberenyi, J. and

Goldenberg, C.J. (1987)

The secondary structure of a messenger RNA precursor probed with psoralen is melted in an in vitro splicing reaction.

Nucleic Acids Res. 15, 9279-9298.

Zeitlin, S. and Efstratiadis, A. (1984)

In vivo splicing products of the rabbit  $\beta$ -globin pre-mRNA.

Cell 39, 589-602.

Zeitlin, S., Parent, A., Silverstein, S. and Efstratiadis, A. (1987)

Pre-mRNA splicing and the nuclear matrix.

Mol. Cell. Biol. 7, 111-120.

Zeitlin, S., Wilson, R.C., Parent, A. and Efstratiadis, A. (1988)

In vivo or in vitro assembled self-splicing and complementable complexes. Abstracts of papers presented at the 1988 meeting on RNA processing, pp.112, Cold Spring Harbor Lab.

Zaug, A.J. and Cech, T.R. (1986)

The intervening sequence RNA of Tetrahymena is an enzyme.

Science 231, 470-475.

Zhuang, Y. and Weiner, A.M. (1986)

A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. Cell 46, 827-835.